

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
26. April 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/29238 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82, 9/10, C12P 21/00, A01H 5/00, C12P 7/64 (74) Anwalt: MAIWALD, Walter; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10363 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 20. Oktober 2000 (20.10.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 50 589.6 20. Oktober 1999 (20.10.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): GESELLSCHAFT FÜR ERWERB UND VERWERTUNG VON SCHUTZRECHTEN - GVS MBH [DE/DE]; Kaufmannstrasse 71-73, 53115 Bonn (DE).
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): WOLTER, Frank, P. [DE/DE]; Moselweg 9, 53347 Alfter-Oedekoven (DE). HAN, Jixiang [CN/GB]; No. 13, 902 Arrowhead Drive, Oxford, OH 45056 (GB). FRENTZEN, Margrit [DE/DE]; Nizzaallee 46a, 52072 Aachen (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ELONGASE PROMOTERS FOR THE TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION OF TRANSGENES IN PLANTS

(54) Bezeichnung: ELONGASEPROMOTOREN FÜR GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION VON TRANSGENEN IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to chimerical genes that have (i) a DNA sequence coding for a desired product, and (ii) an elongase promoter. The DNA sequence is functionally linked with the promoter to allow expression of the product under the control of the promoter. The invention further relates to vectors, plant cells, plants and plant parts and microorganisms that contain the chimerical gene and to methods for producing such vectors, plant cells, plants and plant parts and microorganisms. The invention also relates to elongase-encoding sequences from *Brassica napus* and to transgenic plants and microorganisms expressing said sequences.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft chimäre Gene mit (i) einer DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes Produkt kodiert, und (ii) einem Elongasepromotor, worin die DNA-Sequenz mit dem Promotor operativ verknüpft ist, um Expression des Produkts unter Kontrolle des Promotors zu erlauben. Die Erfindung betrifft weiter Vektoren, Pflanzenzellen, Pflanzen und Pflanzenteile sowie Mikroorganismen, die das chimäre Gen enthalten sowie Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen, Pflanzen und Pflanzenteile und Mikroorganismen. Weiter betrifft die Erfindung für Elongase kodierende Sequenzen aus *Brassica napus* und transgene Pflanzen sowie Mikroorganismen, die diese Sequenzen exprimieren.

WO 01/29238 A2

45  
14  
59

**Elongasepromotoren für gewebespezifische Expression  
von Transgenen in Pflanzen**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft chimäre Gene mit (i) einer DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes Produkt kodiert, und (ii) einem Elongasepromotor, worin die DNA-Sequenz mit dem Promotor operativ verknüpft ist, um Expression des Produkts unter Kontrolle des Promotors zu erlauben. Die Erfindung betrifft weiter Vektoren, Pflanzenzellen, Pflanzen und Pflanzenteile, die das chimäre Gen enthalten sowie Verfahren zur Herstellung solcher
- 10 Pflanzenzellen, Pflanzen und Pflanzenteile. Die Erfindung betrifft auch für aktive Elongase-Enzyme kodierende Sequenzen aus *Brassica napus* und transgene Mikroorganismen und Pflanzen, die für Elongase kodierende Sequenzen enthalten. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Verschiebung der Kettenlänge von Fettsäuren hin zu länger-kettigen Fettsäuren in transgenen Pflanzen und zur Herstellung von länger-kettigen, mehrfach ungesättigten
- 15 Fettsäuren in Mikroorganismen und Pflanzen.

Langkettige Fettsäuren, die über 18 Kohlenstoffatome umfassen und auch als very-long-chain fatty acids (VLCFAs) bezeichnet werden, sind in der Natur weit verbreitet. Diese Fettsäuren kommen in erster Linie in Samenölen verschiedener Pflanzenspezies vor, wo sie meist

20 eingebaut in Triacylglyceride vorliegen. In dieser Form findet man VLCFAs insbesondere in Brassicaceae, Tropaeolaceae und Limnanthaceae. Die Samenöle der Brassicaceae-Familie, wie *Brassica napus*, *Crambe abyssinica*, *Sinapsis alba*, *Lunaria annua*, enthalten üblicherweise 40-60% Erucasäure (cis-13-Docosensäure, 22:1<sup>Δ13</sup>), während in der Tropaeolaceae-Familie auch bis zu 80% Erucasäure im Samenöl vorkommen können. Die Samenöle der

25 *Limnanthes*-Spezies oder Jojoba enthalten sogar mehr als 90% VLCFAs.

In Samenölen akkumulieren VLCFAs gewöhnlicherweise als cis n-9 einfach ungesättigte Fettsäuren wie 20:1<sup>Δ11</sup>, 22:1<sup>Δ13</sup> und 24:1<sup>Δ15</sup>, wobei in einigen Spezies auch VLCFAs vom cis n-7-Typ vorkommen, wie z.B. 20:1<sup>Δ13</sup> in *Sinapsis alba*, und beispielsweise im Öl von

30 *Limnanthes*-Spezies 20:1<sup>Δ5</sup> vorherrscht.

- 2 -

- Die Anwendungsgebiete pflanzlicher Fette und Öle reichen von Wasch- und Reinigungsmitteln über Kosmetikartikel bis zu Farbzusätzen, Schmierstoffen und Hydraulikölen. Insbesondere ein hoher Gehalt an Erucasäure gilt in der klassischen wie der modernen Pflanzenzüchtung als Zuchtziel, da sie nicht nur als Antischaummittel in Waschmitteln oder als Antiblockiermittel bei der Kunststoffherstellung zum Einsatz kommt, sondern Erucasäure und ihre Derivate, wie Arachinsäure, Pelagonsäure, Brassylsäure und Erucasäureamide, auch als Konservierungsmittel, Aromastoff, Kunststoffweichmacher, Formulierungsmittel, Flotationsmittel, Netzmittel, Emulgator und Gleitmittel Anwendung finden.
- 10 VLCFAs werden durch sukzessive Übertragung von C<sub>2</sub>-Einheiten von Malonyl-CoA auf langkettige Acylgruppen, die aus der *de novo*-Fettsäuresynthese in den Plastiden stammen. Diese Elongationsreaktionen werden durch Fettsäure-Elongasen (FAE) katalysiert, wobei jeder Elongationszyklus aus vier enzymatischen Schritten besteht: (1) Kondensation von Malonyl-CoA mit einem langkettigen Acylrest, wodurch  $\beta$ -Ketoacyl-CoA entsteht, (2)
- 15 Reduktion des  $\beta$ -Ketoacyl-CoAs zu  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA, (3) Dehydrierung von  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA zu trans-2,3-Enoyl-CoA, (4) Reduktion von trans-2,3-Enoyl-CoA, was in einem verlängerten Acyl-CoA resultiert. Die Kondensationsreaktion, die durch eine  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS) katalysiert wird, ist der Geschwindigkeits-limitierende Schritt der Kettenverlängerung.
- 20 VLCFAs reichern sich vorrangig in Triacylglyceriden von Samen der meisten *Brassica*-Spezies wie *Brassica napus* an. In sich entwickelnden Ölsamen werden Triacylglyceride über den Kennedy-Pathway synthetisiert, an dem in erster Linie die folgenden vier enzymatischen Reaktionen beteiligt sind. Zuerst wird Glycerol-3-Phosphat durch Acyl-CoA an der sn-1-
- 25 Position acyliert, um Lysophosphatidat (sn-1-Acylglycerol-3-Phosphat) zu bilden. Diese Reaktion wird durch eine sn-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) katalysiert. Dann erfolgt ein zweiter Acylierungsschritt, katalysiert durch eine sn-1-Acylglycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT), wodurch Phosphatidat

- 3 -

entsteht, das im nächsten Schritt durch Hydrolyse, katalysiert durch eine Phosphatidat-Phosphatase, zu Diacylglycerol (DAG) umgewandelt wird. Schließlich wird DAG an seiner sn-3-Position durch eine sn-1,2-Diacylglycerol-Acyltransferase (DAGAT) zu einem Triacylglycerid acyliert.

5

Während der letzten Jahre konnten KCS-Gene aus *A. thaliana* und Jojoba kloniert werden. Durch Transposon-Tagging mit dem Mais-Transposonaktivator gelang die Klonierung des Fettsäureelongationsgens 1 (FAE1), dessen Produkt an der VLCFA-Synthese beteiligt ist (James *et al.* (1995) Plant Cell 7:309-319). Weiterhin konnte ein cDNA-Klon aus Jojoba von  
10 Lassner *et al.* aus einer cDNA-Bank aus sich entwickelnden Samen isoliert werden. (1996, Plant Cell 8:281-292). Kürzlich gelang die Klonierung des *A. thaliana* KCS1-Gen (Todd *et al.* (1999) Plant J. 17:119-130). Die Isolierung einer cDNA, die für eine 3-Ketoacyl-CoA-Synthase aus *Brassica napus* kodiert, wurde 1997 von Clemens und Kunst beschrieben (Plant Physiol. 115, 313-314); allerdings scheint die in diesem Stand der Technik offenbarte cDNA-  
15 Sequenz nicht für ein aktives Enzym zu kodieren.

Obwohl es sich bei Raps um die wichtigste Produktionsstätte pflanzlicher Öle handelt und die moderne Pflanzenzüchtung aus diesem und weiteren Gründen ein besonders großes Interesse an nützlichen Genen aus eben dieser Kulturpflanze hat, konnte ein  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-  
20 Gen aus Raps, das für ein aktives Enzym kodiert bzw. dessen Übertragung auf transgene Organismen auch tatsächlich in einer nachweisbaren KCS-Aktivität resultiert, bisher nicht erfolgreich isoliert werden.

Rapsöl enthält natürlicherweise hohe Konzentrationen an Erucasäure (~ 50%) und Rapssorten  
25 mit hohem Erucasäuregehalt (high erucic acid rapeseed, HEAR) sind die Hauptquelle für Erucasäure als industrieller Futterbestand. Jedoch ist der gegenwärtige Gehalt von 55% Erucasäure in den Samenölen von HEAR-Sorten nicht ausreichend, um angesichts der hohen Kosten der Aufreinigung der Erucasäure mit den Alternativquellen aus Petrochemikalien

- 4 -

konkurrieren zu können. Die Erhöhung des Erucasäuregehalts im Rapsöl mittels gentechnologischer Verfahren könnte hier Abhilfe schaffen und die industrielle Nützlichkeit von Raps als Erucasäureproduzent deutlich verbessern. Andererseits ist Erucasäure aufgrund ihrer unangenehmen geschmacklichen und anderer negativen Eigenschaften als Bestandteil  
5 von Lebensmitteln unerwünscht, was während der letzten Jahre zur Züchtung von Rapssorten mit niedrigem Erucasäuregehalt (low erucic acid rapeseed, LEAR) führte, die fast frei von Erucasäure im Samenöl sind. Rapssorten lassen sich somit in für die Industrie interessante HEAR-Sorten einerseits und ernährungstechnisch vorteilhafte LEAR-Sorten andererseits unterteilen.

10

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Gens bzw. eines darauf basierenden Verfahrens, mit dem der Gehalt an 22:1-Fettsäuren in Pflanzen und insbesondere in Ölsaaten besonders vorteilhaft gesteigert werden kann.

15

Diese Aufgabe wird durch die erfolgreiche Isolierung und Charakterisierung eines KCS-Gens aus *Brassica napus* gelöst.

Es wurde jetzt überraschend gefunden, daß sich KCS-Gene und insbesondere das in den  
20 Ausführungsbeispielen beschriebene KCS-Gen aus Raps gut für die Erhöhung des Gehalts an VLCFA und insbesondere an 22:1-Fettsäuren in transgenen Organismen, insbesondere in Ölsaaten, eignen. Dabei ist nicht nur der besonders hohe Gehalt an Erucasäure, der durch Expression des erfindungsgemäßen KCS-Gens erreicht werden kann, vorteilhaft gegenüber dem Stand der Technik, sondern auch die beobachtete Erhöhung des Verhältnisses von 22:1-  
25 Fettsäuren zu den weniger erwünschten 20:1-Fettsäuren.

Langkettige Fettsäuren besitzen auch im Nahrungsmittel- und Pharmabereich große Bedeutung. Hier sind es allerdings in erster Linie die mehrfach ungesättigten langkettigen

- 5 -

Fettsäuren (engl.: long chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFA), deren essentielle Bedeutung für die menschliche Gesundheit in letzter Zeit immer deutlicher wurde. Es handelt sich um Fettsäuren mit zwei, vor allem aber drei und mehr Doppelbindungen und Kettenlängen von 18 und mehr Kohlenstoffatomen, vor allem aber solchen Kettenlängen von 22 und 24. Wichtige Vertreter sind die Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure), die Eicosapentaensäure (5,8,11,14,17-Icosapentaensäure, EPA) und die Docosapentaensäure (Clupanodonsäure, 4,8,12,15,19-Docosapentaensäure, DHA). Als natürliche Quelle für LC-PUFA steht vor allem Fisch zur Verfügung. Bei dem neuerdings erkannten hohen Bedarf und der jetzt schon bedrohlichen Überfischung der Meere ist der Weltbedarf aus dieser Quelle auf Dauer nicht zu decken. Biotechnologische Methoden zur Herstellung rücken daher in den Vordergrund. Für diese Produktion kommen dabei vor allem Mikroorganismen und Pflanzen in Betracht. Bei den Mikroorganismen bieten sich vor allem Hefen, Pilze und Bakterien an.

Die Biosynthese dieser Fettsäuren verläuft ausgehend von den weit verbreiteten Fettsäuren Linolsäure und alpha-Linolensäure über wechselweise erfolgende Desaturierungs- und Elongationsschritte. Vor allem die hierfür notwendigen Desaturasen sind Objekt intensiver Forschung, deren Gene vor allem aus marinen Mikroorganismen isoliert wurden und dem Fachmann bekannt sind. Ein noch nicht befriedigend gelöstes Problem stellen die notwendigen Elongationsschritte dar, da die in den Zielorganismen befindlichen Elongase-Systeme diese Fettsäuren entweder gar nicht oder nur unzureichend elongieren.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher in der Bereitstellung eines  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Gens und eines entsprechenden Verfahrens, mit dem PUFA sowohl in Mikroorganismen als auch in Pflanzen zu den gewünschten sehr langkettigen LC-PUFA-Spezies von 20 und mehr Kohlenstoffatomen elongiert werden können. Bei den LC-PUFA handelt es sich insbesondere um  $18:2^{9, 12}$ ,  $18:3^{9, 12, 15}$ ,  $18:3^{6, 9, 12}$ ,  $20:3^{8, 11, 14}$  und  $20:4^{5, 8, 11, 14}$ .

- 6 -

Das Problem der Elongation von PUFA und vor allem sehr langkettigen PUFA mittels molekularbiologischer Techniken und geeigneter Gene ist im Stand der Technik bis dato nicht in befriedigender Weise gelöst worden.

- 5 Diese Aufgabe wird jetzt gelöst durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von längerkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Elongation kürzerkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren in transgenen Mikroorganismen und Pflanzen durch Elongation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wobei die Elongation durch eine  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase in den transgenen Mikroorganismen oder Pflanzen katalysiert wird. Bevorzugt  
10 handelt es sich bei der KCS um ein Enzym, das natürlicherweise in Raps vorkommt.

- Dabei können nicht nur natürlicherweise vorkommende mehrfach ungesättigte Fettsäuren elongiert werden, sondern auch solche mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die der Mikroorganismus oder die Pflanze aus seiner bzw. ihrer Umgebung aufnimmt. Weiter können  
15 auch solche mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch die enzymatische Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase elongiert werden, die durch gentechnische Veränderungen des Zielorganismus, also des Mikroorganismus oder der Pflanze, in dem Zielorganismus erzeugt werden. Hierbei bietet sich insbesondere die Co-Expression von Desaturase-Genen in dem Zielorganismus an, die die Bereitstellung der gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren  
20 als Substrat für die  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase gewährleisten. Selbstverständlich können Desaturase-Gene in dem Zielorganismus auch mit weiteren Elongase-Genen co-exprimiert werden, um die gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren, also mit gewünschter Kettenlänge, im Zielorganismus bereitzustellen.

- 25 Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Herstellung von längerkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LC-PUFA) durch Elongation kürzerkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien, Hefen und Pilzen, sowie in Pflanzenzellen durch (i) Elongation von natürlicherweise vorkommenden mehrfach

- 7 -

ungesättigten Fettsäuren oder (ii) Elongation von aus der Umgebung aufgenommenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, umfassend die Schritte:

- 5 a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in dem Mikroorganismus oder der Pflanzenzelle aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz vorliegt, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf Mikroorganismen oder pflanzliche Zellen,
- 10 c) im Falle von pflanzlichen Zellen ggf. Regeneration vollständig transformierter Pflanzen, und
- d) falls erwünscht, Vermehrung der erzeugten transgenen Organismen.

15 Im Fall von transgenen Pflanzenzellen müssen nicht in jedem Fall vollständige transgene Pflanzen regeneriert werden. Je nach Bedarf kann es wünschenswert sein, die Produktion der langkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LC-PUFA) in Pflanzenzellen, z.B. in Form von Suspensionskulturen oder Kalluskulturen durchzuführen.

20 Die Beobachtung, daß die erfindungsgemäß verwendeten KCS-Gene, und hier insbesondere das KCS-Gen aus Raps, in transgenen Organismen und Zellen ein Genprodukt erzeugen, das in der Lage ist, PUFA und insbesondere LC-PUFA zu elongieren, ist äußerst überraschend. Bisher war lediglich bekannt, daß KCS eine Rolle bei der Elongation von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren spielen.

25 Bei der Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert, handelt es sich bevorzugt um eine Nukleinsäuresequenz aus *Brassica napus*. Besonders bevorzugt handelt es sich um eine Nukleinsäuresequenz, umfassend die in SEQ ID No. 1 angegebene Sequenz, oder Teile davon. Weitere KCS-Gene kann der Fachmann der



Literatur und den Gendatenbanken entnehmen. Dabei ist der von Clemens und Kunst 1997 in Plant Physiol. (Vol. 115, Seiten 113-114) unter Hinweis auf die Accession No. AF009563 offenbarte cDNA-Klon ausdrücklich ausgenommen, da die hier beschriebene cDNA-Sequenz nicht für ein Protein mit der Aktivität einer KCS kodiert. Der Nachweis einer KCS-  
5 enzymatischen Aktivität wurde von den Autoren aus nicht erbracht; der Stand der Technik beschränkt sich vielmehr auf die Offenbarung der in Accession No. AF009563 zugänglichen Sequenz.

10 In einer besonderen Ausführungsform werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens solche mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere LC-PUFA, elongiert, die durch gentechnische Manipulationen im Zielorganismus erzeugt werden, wobei die gentechnischen Manipulationen die Expression von Desaturase-Genen sowie die Expression weiterer Elongase-Gene umfassen kann.

15 Für die Produktion sehr langkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wie Arachidonsäure oder Eicosapentaensäure sind  $\Delta 6$ - und  $\Delta 5$ -Desaturase-Gene erforderlich. Geeignete Gene wurden aus verschiedenen Organismen kloniert und stehen dem Fachmann zur Verfügung, siehe z.B. Sperling et al. (2000), Eur. J. Biochem. 267, 3801-3811; Cho et al. (1999), J. Biol. Chem. 274, 471-477; Sakoradani et al. (1999), Gene 238, 445-453; Sayanova et al. (1999),  
20 Journal of Experimental Botany 50, 1647-1652; Girke et al. (1998), The Plant Journal 15, 39-48; Huang et al. (1999), Lipids 34, 649-659; Saito et al. (2000), Eur. J. Biochem. 267, 1813-1818; Cho et al. (1999), J. Biol. Chem. 274, 37335-37339; Knutzon et al. (1998), J. Biol. Chem. 273, 29360-29366; Michaelson et al. (1998), J. Biol. Chem. 273, 19055-19059; Broun et al. (1999), Annu. Rev. Nutr. 19, 197-216; Napier et al. (1998), Biochem. J. 230, 611-614;  
25 Nunberg et al. (1996), Plant Physiol. 111 (Supplement.), 132; Reddy et al. (1996), Nat. Biotechnol. 14, 639-642; Sayanova et al. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4211-4216.

Je nach erwünschter langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäure müssen neben geeigneten Desaturase-Genen auch weitere Gene, wie Elongase-Gene übertragen werden. So sollte z.B. bei der Produktion von Docosapentaensäure (22:6) neben einer  $\Delta 6$ -Desaturase, die die  $\Delta 6$ -Desaturierung zu 24:6 gewährleistet, auch eine Elongase exprimiert werden, die die

5 Elongation von 22:5 in 24:5 katalysiert.

Geeignete Desaturase- und Elongase-Gene kann der Fachmann der Literatur sowie den Gendatenbanken problemlos entnehmen. Für  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthasen, die  $\gamma$ -Linolensäure (GLA) elongieren können, wurden bereits aus *C. elegans* und *Mortierella alpina* geeignete

10 Gene kloniert (siehe z.B. Das et al. (2000), 14th International Symposium on Plant Lipids, Cardiff, 23/28 July 2000 ("Polyunsaturated fatty acids specific elongation enzymes"), Beaudoin et al. (2000), 14th International Symposium on Plant Lipids, Cardiff, 23/28 July 2000 ("Production of C20 polyunsaturated fatty acids by pathway engineering: Identification of a PUFA elongase component"); Beaudoin et al. (2000), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97,

15 5421-5426.

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur Herstellung von längerkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (LC-PUFA) durch Elongation kürzerkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien, Hefen und Pilzen, sowie in

20 Pflanzenzellen durch Elongation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die in dem Mikroorganismus bzw. der Pflanzenzelle aufgrund der Expression eines oder mehrerer eingeführten Desaturase- oder/und Elongase-Gene erzeugt werden, umfassend die Schritte:

- 25 a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in dem Mikroorganismus oder der Pflanzenzelle aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz vorliegt, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert,

- 10 -

- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf Mikroorganismen oder pflanzliche Zellen,
- c) im Falle von pflanzlichen Zellen ggf. Regeneration vollständig transformierter Pflanzen, und
- d) falls erwünscht, Vermehrung der erzeugten transgenen Organismen.

Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Änderung der  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Aktivität in transgenen Pflanzen durch Übertragung und Expression einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase aus *Brassica napus* kodiert. Vorzugsweise umfasst die Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, die in SEQ ID No. 1 angegebenen Sequenz oder Teile davon.

Neben Bakterien, Pilzen und Hefen können auch Algen für die Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Weiter besteht eine Aufgabe der Erfindung in der Bereitstellung eines neuen samenspezifischen Promotors für die Herstellung transgener Pflanzen mit veränderter Genexpression.

Diese Aufgabe wird durch die Isolierung und Charakterisierung eines KCS-Promotors gelöst, der sich für die samenspezifische Expression beliebiger kodierender Regionen in Pflanzen eignet. Wie weiter unten gezeigt werden wird, handelt es sich bei dem KCS-Promotor um einen besonders starken Promotor, der für die gewebespezifische Expression interessanter Gene in Pflanzen besonders nützlich ist. Dabei kann der KCS-Promotor als Translations- oder Transkriptionsfusion mit gewünschten kodierenden Regionen vorliegen und auf Pflanzen-

zellen übertragen werden. Sowohl die Herstellung geeigneter chimärer Genkonstrukte wie auch die Transformation von Pflanzen mit diesen Konstrukten kann der Fachmann mittels Standardmethoden durchführen. Siehe bspw. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, bzw. Willmitzer L. (1993) *Transgenic Plants*, in: *Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise* (H.J.Rehm, G.Reed, A.Pühler, P.Stadler, eds., Vol.2, 627-659, V.C.H. Weinheim - New York - Basel - Cambridge. Zur Erzeugung der erfindungsgemäßen Pflanzen bieten sich verschiedene Methoden an. Zum einen können Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit Hilfe herkömmlicher gentechnologischer Transformationsmethoden derart verändert werden, daß die neuen Nukleinsäuremoleküle in das pflanzliche Genom integriert werden, d.h. daß stabile Transformanten erzeugt werden. Zum anderen kann ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, dessen Anwesenheit und gegebenenfalls Expression in der Pflanzenzelle einen veränderten Fettsäuregehalt bewirkt, in der Pflanzenzelle bzw. der Pflanze als selbstreplizierendes System enthalten sein. Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, deren Replikationssignale für *E.coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann in einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird dann für die Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E.coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert, und das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysenmethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl bekannter Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation

pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten. Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide, wie z.B. pUC-Derivate, verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig. Dem Fachmann sind die Genselektionsmarker bekannt, und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen. Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- bzw. Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden. Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und ein Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig

transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in allseits bekannten Übersichtsartikeln und Handbüchern zur Pflanzentransformation beschrieben worden. Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können

5 Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biocide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert

10 werden. Die Regeneration der Pflanzen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplasten-Transformation sind ebenfalls bekannt und vielfach beschrieben. Ist die

15 eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biocid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonyl-Harnstoff, Genta-

20 mycin oder Phosphinotricin und u.a. vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten. Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise. Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die

25 daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden. Es sollten zwei oder mehrere Generationen herangezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um

sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind. Ebenso können nach üblichen Methoden transgene Linien bestimmt werden, die für die neuen Nukleinsäuremoleküle homozygot sind, und ihr phänotypisches Verhalten hinsichtlich eines veränderten Fettsäuregehalts untersucht und mit dem von hemizygoten Linien  
5 verglichen werden.

Für die Übertragung eines Resistenzmarkers bietet sich auch eine Co-Transformation an, bei der der Resistenzmarker separat übertragen wird. Die Co-Transfektion ermöglicht auf einfache Weise die anschließende Entfernung des Resistenzmarkers durch Auskreuzen.

10

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nukleinsäuremoleküle oder Fragmente davon, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder Promotorregion hybridisieren. Der Begriff „Hybridisierung“ bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen,  
15 wie sie bspw. in Sambrook et al., supra, beschrieben sind. Die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder Promotorregionen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der Nukleinsäuresequenzen und Promotorregionen. Der Ausdruck „Derivat“ bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den erfindungsgemäßen Sequenzen an einer oder mehreren

20 Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 50%, bevorzugt von mindestens 70-80% und besonders bevorzugt über 90%. Die Abweichungen können durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

25 Bedingungen, die eine selektive Hybridisierung gewährleisten, kann der Fachmann üblichen Laborhandbüchern entnehmen, beispielsweise Sambrook et al., supra.

- 15 -

Für die samenspezifische Expression der erfindungsgemäßen KCS-Sequenzen in transgenen Pflanzen eignet sich jedes samenspezifische Regulationselement, insbesondere Promotoren. Als Beispiele erwähnt seien hier der USP-Promotor (Bäumlein et al. 1991, Mol. Gen. Genet. 225:459-467), der Hordein-Promotor (Brandt et al. 1985, Carlsberg Res. Commun. 50:333-345), sowie der Napin-Promotor, der ACP-Promotor und die FatB3- und FatB4-Promotoren, die dem auf dem Gebiet der pflanzlichen Molekularbiologie tätigen Fachmann wohl bekannt sind.

Gegebenenfalls können die Nukleinsäuresequenzen oder Promotorregionen der Erfindung durch Enhancer-Sequenzen oder andere regulatorische Sequenzen ergänzt sein. Die regulatorischen Sequenzen beinhalten z.B. auch Signalsequenzen, die für den Transport des Genprodukts zu einem bestimmten Kompartiment sorgen.

Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen handelt es sich bevorzugt um Ölsaaten, insbesondere um Raps, Rüpsen, Sonnenblume, Sojabohne, Erdnuß, Kokospalme, Ölpalme, Baumwolle, Lein.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Bereitstellung samenspezifischer Expression einer kodierenden Region in Pflanzensamen, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine Promotorregion, die natürlicherweise upstream einer für ein Protein mit der Aktivität einer KCS kodierenden Sequenz vorliegt, in operativer Verknüpfung mit einer heterologen kodierenden Region vorliegt,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und
- c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

Als kodierende Region, die unter Kontrolle eines erfindungsgemäßen KCS-Promotors in transgenen Pflanzen exprimiert wird, eignet sich jede für ein nützliches Protein kodierende



- 16 -

Region, wobei das Protein insbesondere lebensmitteltechnisch, pharmazeutisch oder kosmetisch, landwirtschaftlich oder für die chemische Industrie nützlich sein kann. Beispiele sind Proteine, die eine Rolle in der Fettsäurebiosynthese und im Lipidstoffwechsel spielen, wie Desaturasen und Elongasen, Acyltransferasen, Acyl-CoA-Synthetasen, Acetyl-CoA-Carboxylasen, Thioesterasen. Zu erwähnen sind auch Glykosyltransferasen, Zuckertransferasen und Enzyme, die am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt sind. Prinzipiell aber kann jedes interessante Protein unter Verwendung der erfindungsgemäßen KCS-Promotoren samenspezifisch exprimiert werden, so daß Samen auch allgemein als Bioreaktor für die Expression hochwertiger Proteine genutzt werden können. Die erfindungsgemäßen KCS-Promotoren eignen sich auch allgemein dazu, die Strukturbeschaffenheit und Farbe von Pflanzensamen zu beeinflussen.

Die erfindungsgemäßen Promotorregionen können aber auch vorteilhaft zur gewebe-spezifischen Ausschaltung unerwünschter Genaktivitäten eingesetzt werden, wobei sich hier Antisense- und Cosuppressionstechniken anbieten.

Die Erfindung betrifft dabei nicht nur chimäre Gene, sondern auch die natürlicherweise vorkommende Kombination des KCS-Promotors mit der für die KCS kodierenden Region.

Bei dem KCS-Promotor handelt es sich bevorzugt um eine Promotorregion, die natürlichweise die Expression eines KCS-Gens in Brassicaceen, besonders bevorzugt in *Brassica napus*, kontrolliert. Am meisten bevorzugt handelt es sich bei der Promotorregion um eine Sequenz, die von der in SEQ ID No. 2 dargestellten Sequenz umfasst ist, wobei die Promotorregion mindestens die beiden Promotorelemente TATA-Box und CAAT-Box umfasst (siehe auch Hervorhebung in Abbildung 6).

- 17 -

Weiter ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Verschiebung der Kettenlänge von Fettsäuren hin zu längerkettigen Fettsäuren in transgenen Pflanzen, insbesondere in Ölsaaten, umfassend die Schritte:

- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in Pflanzen, insbesondere in  
5 Samengewebe aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer für eine KCS aus Raps kodierenden Nukleinsäuresequenz, insbesondere mit einer kodierenden Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder mit einer für ein Protein gemäß SEQ ID No. 1 bzw. 3 kodierenden Sequenz, vorliegt,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und
- 10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

Außerdem ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Erhöhung des Verhältnisses von 22:1-Fettsäuren zu 20:1-Fettsäuren in transgenen Pflanzen, insbesondere in Ölsaaten,  
15 umfassend die Schritte:

- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in Pflanzen, insbesondere in  
Samengewebe aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer für eine KCS aus Raps kodierenden Nukleinsäuresequenz, insbesondere mit einer kodierenden Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder einer für ein Protein gemäß SEQ ID No. 1 bzw. 3 kodierenden  
20 Sequenz, vorliegt,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und
- c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

- 25 Die vorgenannten Verfahren sind nicht auf die Anwendung in transgenen Pflanzenzellen bzw. Pflanzen beschränkt, sondern eignen sich auch für die Verschiebung der Kettenlänge von Fettsäuren hin zu längerkettigen Fettsäuren bzw. für die Erhöhung des Verhältnisses von

22:1-Fettsäuren zu 20:1-Fettsäuren in transgenen Mikroorganismen, wie Pilzen, Hefen und Bakterien, sowie Algen.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für ein  
5 Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, zur Herstellung transgener Mikroorganismen oder Pflanzenzellen mit einem gegenüber den Ausgangsformen zu längerkettigen Fettsäuren verschobenen Muster an mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Der Begriff „Ausgangsform“ wird hier verwendet, um sowohl den Wildtyp-Mikroorganismus  
10 bzw. die Wildtyp-Pflanzenzelle bzw. -pflanze als auch solche Mikroorganismen bzw. Pflanzenzellen einzuschließen, in die zusätzlich zu der für eine KCS kodierenden Nukleinsäuresequenz auch Sequenzen für Desaturase- und/oder weitere Elongase-Gene eingeführt wurden.

15 Vorzugsweise handelt es sich bei der Nukleinsäuresequenz auch hier um eine Nukleinsäuresequenz, die für eine KCS aus Raps kodiert, besonders bevorzugt um eine Nukleinsäuresequenz, die von der in SEQ ID Nr. 1 angegebenen DNA-Sequenz umfasst ist.

Es versteht sich, daß bei Verwendung der Formulierung „Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ  
20 ID 1“ auch solche Nukleinsäuresequenzen umfasst sind, die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus

- a) DNA-Sequenzen, die eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die die in SEQ ID No. 1 oder 3 angegebene Aminosäuresequenz oder Fragmente davon kodieren,
- b) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID No. 1 angegebene Nukleinsäuresequenz  
25 oder Teile davon enthalten,
- c) DNA-Sequenzen, die eine Nukleinsäuresequenz, die mit einem komplementären Strang der Nukleinsäuresequenz von a) oder b) hybridisieren, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfassen,

- 19 -

- d) DNA-Sequenzen, die eine Nukleinsäuresequenz, die zu einer Nukleinsäuresequenz von a), b) oder c) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleinsäuresequenz umfassen,
- 5 e) DNA-Sequenzen, die ein Derivat, Analog oder Fragment einer Nukleinsäuresequenz von a), b), c) oder d) darstellen.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung.

10

### Beispiele

Beispiel 1: Isolierung eines vollständigen KCS-cDNA-Klons aus *Brassica napus*

- 15 Ein ca. 1,0 kb langes Fragment wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer
- 1: 5'-ATG ACG TCC GTT AAC GTT AAG-3' (sense)
- und
- 2: 5'-ATC AGC TCC AGT ATG CGT TC-3' (antisense)
- 20 aus der kodierenden Region des Arabidopsis-Fettsäureelongationsgens 1 (FAE1, James *et al.*, *supra*) amplifiziert. Dieses Fragment wurde als heterologe Sonde für das Screenen einer Raps  $\lambda$ -ZAP cDNA-Library aus unreifen Schoten von *B. napus* cv. Askari (Fulda et al. (1997) Plant Mol. Biol. 33:911-922) verwendet. Askari ist eine HEAR-Linie, die in ihrem Samenöl 55% Erucasäure enthält. 5 positive cDNA-Klone konnten aus ca.  $1 \times 10^6$  Plaques isoliert werden.
- 25 Restriktionsanalyse ergab, daß alle 5 Klone ein Insert von etwa 1,7 kb Länge enthielten. Sequenzanalyse zeigte, daß die überlappenden Regionen von sowohl dem 5'- als auch dem 3'-Ende der cDNAs identisch waren (etwa 800 bp), daß aber in allen cDNAs 8-14 Nukleotide am 5'-Ende, vermutlich einschließlich des Startcodons, fehlten. Um einen vollständigen

- 20 -

cDNA-Klon zu erhalten, wurde eine homologe Sonde von dem längsten cDNA-Klon amplifiziert, unter Verwendung der Oligonukleotidprimer

H1: 5'-CGT TAA CGT AAA GCT CCT TTA C-3' (sense)

5 und

H2: 5'-TAG ACC TGA ACG TTC TTG AAT C-3' (antisense),

und für weitere Screeningexperimente mit der cDNA-Library eingesetzt. Da nach zwei weiteren Screeningrunden immer noch kein vollständiger cDNA-Klon gefunden war, wurde  
10 eine „nested PCR“ mit aus der cDNA-Bank extrahierter Template-DNA eingesetzt, um das 5'-Ende des Inserts zu amplifizieren. Wie die Sequenzanalyse der amplifizierten Fragmente ergab, konnte auch auf diese Weise kein full-length-Klon in der Library detektiert werden. Es wurde daher eine inverse PCR (Ochman et al. (1988) Genetics 120:621-623) für die  
15 Klonierung des fehlenden 5'-Endes mit genomischer DNA aus der Askari-Rapslinie als Template eingesetzt. Zwei spezifische Primer

IP1: 5'-TGA CGT AAT GGT AAA GGA GC-3' (antisense)

und

IP3: 5'-TTC AAG CTC CGA AGC AAC-3' (sense)

20

wurden entsprechend dem 5'-Ende der klonierten cDNA, aber in entgegengesetzten Orientierungen konstruiert. Für den Verdau der genomischen DNA wurde das Restriktionsenzym HindIII verwendet, da zwar eine HindIII-Schnittstelle downstream des Primers IP3, aber keine HindIII-Site in der Region zwischen den Primern lag. Nach Verdau und Ligation  
25 der genomischen DNA, wurde die Orientierung der Primer umgedreht, so daß die PCR ablaufen konnte. Ein 1,5 kb-Fragment konnte mittels DNA-Polymerasen mit proof reading-Kontrolle, wie z.B. pfu von Stratagene, amplifiziert werden. Das PCR-Fragment wurde kloniert und sequenziert. Die DNA-Sequenzen von drei unabhängigen Klonen waren

- 21 -

identisch und enthielten das fehlende 5'-Ende (AGCAATGACGTC, das vermutliche Startcodon ist unterstrichen) der cDNA.

Die vollständige Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz der KCS-cDNA  
5 aus *B. napus* cv. Askari ist in Abbildung 1 gezeigt (SEQ ID Nr. 1). Die für die inverse PCR  
verwendeten Primer sind in Abbildung 1 unterstrichen. Ebenfalls unterstrichen sind die  
anderen Primer, die für die Amplifikation genomischer DNA aus *B. napus* cv. Drakkar und  
Linie RS306 eingesetzt wurden (siehe Beispiel 2). Forward und reverse Primer sind durch  
horizontale Pfeile markiert. Das vermutliche Startcodon und Stopcodon sowie die  
10 Polyadenylierungssequenz sind umrandet. Das polyA-Signal des Klons #b3 ist durch einen  
vertikalen Pfeil eingezeichnet. Die vermutliche active site Cys223 ist durch ein gefülltes  
Dreieck markiert.

Der open reading frame (ORF) hat eine Länge von 1521 bp und kodiert für ein Polypeptid  
15 von 506 Aminosäuren (plus Stopcodon), das ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 56,4  
kDa und einen isoelektrischen Punkt von 9,18 hat.

Für die Analyse des Expressionsmusters des KCS-Gens in *B. napus* wurden Northern Blot-  
Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus Blättern und unreifen  
20 Embryos von verschiedenen Entwicklungsstadien von Askari-Rapspflanzen nach Standard-  
methoden isoliert und mit einer *B. napus* KCS-cDNA-spezifischen Sonde hybridisiert. Wie  
erwartet, konnte ein 1,7 kb langes Transkript nur in sich entwickelnden Embryos, aber nicht  
in Blättern detektiert werden. Dieses Transkript war eindeutig nachweisbar in Embryos 16  
Tage nach der Bestäubung, dann nahm seine Konzentration allmählich zu und erreichte ihr  
25 Maximum ungefähr 30 Tage nach der Bestäubung, um dann bis zum 40. Tag nach der  
Bestäubung wieder leicht abzufallen. Diese Northern Blot-Daten zeigten eindeutig, daß die  
Expression des KCS-Gens sowohl zeitlich als auch räumlich in Wildtyppflanzen von Raps  
reguliert ist.

Beispiel 2: Isolierung von genomischen KCS-Klonen aus *B. napus*

- 5 Für die Isolierung genomischer KCS-Klone aus der *B. napus*-Linie RS306, einer HEAR-Linie, und aus *B. napus* cv. Drakkar, einer LEAR-Sorte (22:1 < 1%), wurden die Primer

GP1: 5'-AGG ATC CAT ACA AAT ACA TCT C-3' (sense)

und

- 10 GP2: 5'-AGA GAA ACA TCG TAG CCA TCA-3' (antisense),

- abgeleitet von den 5'- und 3'-UTRs der in Abbildung 1 gezeigten cDNA, eingesetzt. Beide genomischen KCS-Sequenzen, aus RS306 und aus Drakkar, enthielten einen ORF von 1521 bp (identisch zu dem ORF der cDNA, siehe Beispiel 1), was bedeutet, daß das KCS-Gen von
- 15 Raps keine Introns aufweist. Die abgeleiteten Proteine enthalten 506 Aminosäurereste, mit einem Molekulargewicht von 56,46 kDa und einem pI von 9,18 bzw. einem Molekulargewicht von 56,44 kDa und einem pI von 9,23. Verglichen mit der cDNA in Abbildung 1 zeigte die abgeleitete Aminosäuresequenz des genomischen KCS-Klons aus RS306 vier Aminosäureaustausche in den Positionen 286 (Gly286Arg), 323 (Ile323Thr), 395
- 20 (Arg395Lys) und 406 (Ala406Gly), während die genomische Sequenz aus Drakkar nur einen Austausch gegenüber der cDNA aus Askari enthielt, nämlich in Position 282 (Ser282Phe).

- Diese Unterschiede in den Aminosäuresequenzen sind in Abbildung 2 zusätzlich veranschaulicht. BnKCSa = KCS-cDNA aus *B. napus* cv. Askari, BnKCSd = genomischer KCS-
- 25 Klon aus *B. napus* cv. Drakkar, und BnKCSr = genomischer KCS-Klon aus *B. napus* RS306.

Es wird gegenwärtig angenommen, daß die Mutation in Position 282 (Ser282Phe) in einem katalytisch inaktiven KCS-Protein resultiert und dadurch den LEAR-Phenotyp verursacht.

Verschiedene Hinweise stützen die Hypothese, daß der Rest Ser282 von essentieller Bedeutung für die KCS-Aktivität des Wildtyp-Proteins ist, wobei die Rolle des Serin-Restes eher struktureller als katalytischer Art zu sein scheint.

- 5    Schließlich sei darauf hingewiesen, dass sich die in SEQ ID No. 1 dargestellte Sequenz in Aminosäure 307 von der von Clemens und Knust (1997, vide supra) veröffentlichten Sequenz unterscheidet.

- 10   Beispiel 3: Expression von KCS aus *B. napus* in transgenen *B. napus*-Pflanzen

Für die Expression der KCS aus *B. napus* cv. Askari in transgenen Pflanzen wurden zunächst verschiedene Plasmidkonstrukte hergestellt, die in Abbildung 3 veranschaulicht sind. Dabei wurde für die Konstruktion von KCS-Gen-Fusionen eine EcoRI-Schnittstelle (unterstrichen in

- 15   Y1) am 5'-Ende der cDNA durch den Primer

Y1:    5'-GGA ATT CAA ACA AAT GAC GTC CGT TAA CGT AAA GCT-3' (sense)

- eingeführt. Ein 522 bp langes Fragment mit der 509 bp langen kodierenden Region der cDNA  
20   und der 13 bp langen 5'-UTR wurde mittels PCR unter Verwendung des Primerpaars Y1/Y2 amplifiziert und im Agarosegel gereinigt; der Primer Y2 hatte die Sequenz

Y2:    5'-TCT AGC GCA CCA ATG ATA AC-3' (antisense).

- 25   Das Fragment wurde in den pGEM-T-Vektor (Promega) kloniert und sequenziert; der entstandene Vektor wurde mit pNK51 bezeichnet. Die letzten 1,3 kb der cDNA wurden mit ApaI ausgeschnitten und in pNK51, ebenfalls mit ApaI verdaut, ligiert; das entstandene Plasmid wurde pNK52 genannt. Für die Fusion der cDNA mit dem Promotor des Napin-Gens



- gNA aus *B. napus* (Scofield and Crouch (1987) J. Biol. Chem. 262:12202-12208) wurde ein 2,2 kb langes PstI/HindIII-Fragment mit dem Napin-Promotor aus pGEM-Nap ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des pBluescript KS<sup>+</sup>-Vektors (Stratagene) ligiert; der entstandene Vektor wurde pNK53 genannt. Ein 1,7 kb langes Fragment mit der kodierenden
- 5 Region der cDNA und ihrem 3'-PolyA-Signal wurde aus pNK52 mit SpeI/BsmI ausgeschnitten und die Enden mit Klenow aufgefüllt. Das resultierende Fragment mit blunt-Enden wurde downstream von dem Napin-Promotor in pNK53, der zuvor mit HindIII verdaut und ebenfalls mit Klenow behandelt worden war, eingeführt, um pNK54 zu ergeben. Ein 3,9 kb-Fragment mit dem chimären KCS-Gen wurde dann in den SpeI/SalI-verdauten binären
- 10 Vektor pRE1 kloniert, um pNK55 zu liefern. pRE1 weist ein chimäres Neomycin-Phosphotransferase-Gen als Selektionsmarker auf, wobei auch jeder andere für die Transformation von Pflanzen geeignete Vektor und insbesondere jeder andere binäre Vektor eingesetzt werden kann. Für ein Tandemkonstrukt wurde ein 3,3 kb langes SpeI-Fragment, enthaltend ein chimäres *Limnanthes douglasii* LPAAT-Gen, aus pRESS (Weier *et al.* (1997)
- 15 Fett/Lipid 99:160-165) ausgeschnitten und dann in SpeI-verdauten pNK55 ligiert, wodurch das Konstrukt pNKAT55 entstand.

- Für die Konstruktion von Fusionen der für KCS kodierenden Region mit dem Promotor des Acyl-ACP-Thioesterase-Gens FatB<sub>4</sub> aus *Cuphea lanceolata* wurde ein 1,7 kb langes
- 20 EcoRI/XhoI-BCS-Fragment aus pNK54 zwischen den FatB<sub>4</sub>-Promotor und seinem Terminationssignal in einem geeigneten Vektor eingefügt. Ein 5,2 kb-Fragment, enthaltend das chimäre KCS-Gen, wurde mit SfiI ausgeschnitten, seine Enden mit Klenow aufgefüllt und anschließend in pRE1 oder pRESS (Weier *et al.*, *supra*), verdaut mit SmaI, kloniert, wodurch die Vektoren pRTK55 bzw. pRSTK55 entstanden.

25

Für die Herstellung von KCS-Tandemkonstrukten mit einem plsB-Gen, das für die sn-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase aus *E. coli* (Lightner *et al.* (1980) J. Biol. Chem. 19:9413-9420; Lightner *et al.* (1983) J. Biol. Chem. 258:10856-10861) kodiert, wurden zwei

Restriktionsschnittstellen, KpnI (unterstrichen in AT1) und MscI (unterstrichen in AT2), mit den zwei Primern

AT1: 5'-CGG GGT ACC GGC GGC CGC TCT AG-3' (sense)

5 bzw.

AT2: 5'-CGT GGC CAG CCG GCC ATG GTA ATT GTA AAT G-3' (antisense)

eingeführt. Ein 280 bp langes PCR-Fragment, enthaltend einen samenspezifischen DC3-Promotor aus Karotte (Seffens *et al.* (1990) Dev. Genet. 11:65-76) und eine Leadersequenz  $\Omega$  aus Tabakmosaikvirus (Gallie *et al.* (1987) Nucl. Acids Res. 15:3257-3273) wurde in pGEM-T (Promega) kloniert, um pGEM-DC3 zu ergeben. Ein 3,0 kb langes HindIII/SmaI-Fragment, enthaltend die 2,5 kb lange plsB-kodierende Region, die 0,25 kb Ocs-Terminationssequenz sowie die 0,25 kb lange 5'-UTR, wurde aus pHAMPL4 (Wolter *et al.* (1992) EMBO J. 11:4685-4692) ausgeschnitten und in HindIII/HincII-verdauten pBluescript KS<sup>-</sup> kloniert. Die 0,25 kb lange 5'-UTR wurde durch Verdau mit KpnI/MscI entfernt, und ein 300 bp langes DC3 $\Omega$ -Fragment von pGEM-DC3 wurde dann eingefügt, um pDC3-1AT zu ergeben. Das entstandene chimäre Gen (3,1 kb) wurde in den mit SpeI-verdauten Pflanzenexpressionsvektor pNK55 ligiert, um pNKDA55 zu liefern. Für die plsB-Gen-Fusion mit dem Napin-Promotor wurde ein 2,8 kb langes NcoI/NotI-Fragment, enthaltend die plsB-kodierende Region und den Ocs-Terminator von pDC3-1AT, in den mit den gleichen Enzymen doppelverdauten Vektor pGEM-T (Promega) ligiert. Das entstandene Plasmid pGEM-1AT wurde mit ApaI/NotI geschnitten, mit Klenow behandelt und das Fragment mit blunt-Enden in pNK53, mit HindIII verdaut und mit Klenow behandelt, downstream von dem Napin-Promotor eingefügt. Das entstandene chimäre Gen (5,0 kb) wurde mit SpeI ausgeschnitten und in den ebenfalls mit SpeI verdauten Vektor pNK55 ligiert, um pNKNA55 zu ergeben.

Wie erwähnt, sind die hergestellten Pflanzenexpressionskonstrukte in Abbildung 3 schematisch dargestellt; ProNap = Napin-Promotor, ProFatB4 = FatB4-Promotor, ProDC3 = DC3-Promotor, AT2Lim = *Limnanthes* LPAAT-cDNA, KCSRaps = Raps-KCS-cDNA, AT1Ecl = *E. coli* GPAT-Gen, T Kcs, T Fat, T Nap und T Ocs = polyA-Signale von KCS, FatB4, Napin (nap) bzw. *Agrobacterium* Octopin-Synthase (Ocs).

Die erste Gruppe der für die Herstellung transgener Pflanzen eingesetzten Konstrukte besteht somit aus Einzelkonstrukten, in denen die KCS-cDNA unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, entweder des Napin-Gens gNA aus *B. napus* (Scofield *et al.*, *supra*) oder des Acyl-ACP-Thioesterase-Gens FatB<sub>4</sub> aus *Cuphea lanceolata*, steht.

Die zweite Gruppe von Konstrukten besteht aus Doppel- oder Tandemkonstrukten, die ein chimäres KCS-Gen in Kombination mit der kodierenden Sequenz entweder der sn-1-Acylglycerol-3-Phosphat-Acyltransferase von *L. douglasii* (LPAAT) (Hanke *et al.* (1995) Eur. J. Biochem. 232:806-810) oder der sn-Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) aus *E. coli*, unter Kontrolle entweder des Napin-Promotors oder des FatB<sub>4</sub>-Promotors oder des DC3-Promotors von Karotte (Seffens *et al.*, *supra*) plus einer 5'-Leadersequenz ( $\Omega$ ) von Tabakmosaikvirus (Gallie *et al.*, *supra*), enthalten (siehe Abbildung 3, B). Diese Konstrukte wurden in geeignete binäre Vektoren eingeführt und für die Rapstransformation auf *Agrobacterium tumefaciens* (Stämme GV3101/pMP90, Koncz and Schell (1986) Mol. Gen. Genet. 204:383-396, und C58ATHV/pEH101, Hood *et al.* (1986) J. Bacteriol. 168:1291-1301) übertragen. Die Einzelkonstrukte wurden auf die LEAR-Sorte Drakkar und die Doppelkonstrukte auf die HEAR-Linie RS306 übertragen.

Die Transformation erfolgte mittels Cokultivierung von Hypokotyl-Explantaten mit transformierten Agrobakterien, und die transgenen Sprosse wurden auf Kanamycin-haltigem Medium nach Standardmethoden selektiert (siehe De Block *et al.* (1989) Plant Physiol.

91:694-701). Transgene Pflanzen wurden mittels Southern Blot-Analyse unter Verwendung geeigneter Sonden auf Anwesenheit der gewünschten Gene überprüft.

- Reife Samen von transgenen, selbstbestäubten LEAR-Drakkar-Pflanzen, enthaltend die
- 5 Napin-KCS- oder FatB<sub>4</sub>-KCS-Konstrukte, wurde gesammelt, und gepoolter T2-Samen für die Bestimmung der Fettsäurezusammensetzungen der Samenöle eingesetzt. Die gesammelten Daten sind in der unten stehenden Tabelle 1 zusammengefaßt. Tabelle 1 gibt die Fettsäurezusammensetzung von gepoolten T2-Samen von transgenen LEAR-Drakkar-Pflanzen und von Drakkar-Kontrollpflanzen (ck) wieder. T-NK steht für T2-Samen von
- 10 Napin-KCS-Pflanzen, während T-RTK T2-Samen von FatB<sub>4</sub>-KCS-Pflanzen identifiziert.

Tabelle 1

Pflanze	Gewichtsprozent von Fettsäuren								VLCFA
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1	24:1	
Drak (ck)	3.0	1.9	66.7	15.2	8.5	1.9	0.1	0.3	2.3
T-NK-4	3.1	2.2	65.1	9.8	4.6	7.3	5.6	0.4	<u>13.3</u>
T-NK-5	3.5	2.9	66.1	9.7	4.5	8.3	3.4	0.3	<u>12.0</u>
T-NK-10	3.1	2.5	65.8	9.7	4.4	8.0	4.1	0.4	<u>12.5</u>
T-NK-11	3.5	2.4	63.9	10.2	4.6	9.3	3.9	0.4	<u>13.6</u>
T-NK-13	3.3	2.3	61.7	9.3	4.4	11.1	5.9	0.5	<u>17.5</u>
T-NK-14	3.3	2.7	69.9	11.6	4.6	4.2	1.7	0.3	6.2
T-NK-15	2.9	1.9	54.7	8.6	5.5	15.1	9.1	0.5	<u>24.7</u>
T-NK-16	3.4	2.2	67.3	9.6	4.9	8.5	2.2	0.4	<u>11.1</u>
T-NK-18	3.4	2.5	67.6	9.1	4.7	8.7	2.3	0.4	<u>11.4</u>
T-NK-20	3.1	3.5	47.2	6.6	3.5	14.8	15.5	0.7	<u>31.0</u>
T-NK-21	3.5	2.6	67.2	9.9	3.9	7.8	2.5	0.3	<u>10.6</u>
T-NK-24	3.3	2.3	73.4	9.1	4.2	4.4	1.3	0.3	6.0
T-NK-26	3.1	2.3	61.8	12.5	6.7	9.0	2.1	0.2	<u>11.3</u>
T-NK-27	4.1	1.8	58.6	18.6	8.0	4.9	1.6	0.5	7.0
T-NK-30	2.9	1.8	58.2	11.4	6.5	12.6	4.1	0.4	<u>17.1</u>
T-NK-32	2.9	2.1	55.0	10.9	6.6	14.2	5.6	0.5	<u>20.3</u>
T-NK-33	3.5	2.5	60.6	11.2	7.0	7.2	5.1	0.5	<u>12.8</u>
T-NK-34	3.3	1.6	60.3	15.4	8.0	7.2	1.6	0.5	9.3
T-NK-35	2.6	3.2	55.4	6.2	4.1	16.4	6.7	0.6	<u>23.7</u>
T-NK-38	2.9	2.6	69.5	7.0	4.3	8.5	3.0	0.4	<u>11.9</u>
T-NK-40	3.1	1.8	65.5	11.1	7.3	6.4	2.3	0.4	9.1
T-NK-41	3.2	2.7	59.6	9.7	5.7	11.7	4.8	0.5	<u>17.0</u>
T-NK-42	3.6	2.0	60.4	14.4	8.3	6.9	1.8	0.4	9.1
T-NK-43	3.4	1.4	59.8	14.7	10.3	7.0	1.3	0.4	8.7
T-NK-47	3.2	1.8	59.9	14.7	8.7	7.6	1.6	0.4	9.6
T-NK-49	0.3	1.8	54.1	10.8	7.3	12.8	7.5	0.7	<u>21.0</u>
T-NK-50	2.8	2.4	64.1	9.1	5.4	9.4	2.9	0.5	<u>12.8</u>
T-NK-65	2.9	2.2	57.1	9.5	6.0	14.6	5.4	0.5	<u>20.5</u>
T-NK-71	3.7	2.6	66.3	11.4	8.0	3.6	1.7	0.4	5.7
T-NK-82	3.7	2.7	61.5	10.3	5.9	11.1	4.2	0.2	<u>15.5</u>
T-NK-85	3.9	2.3	56.8	14.9	8.6	8.8	2.7	0.4	<u>11.9</u>
T-RTK-2	3.6	2.6	67.9	10.6	4.7	7.5	1.5	0.4	9.4
T-RTK-94	3.1	2.2	64.2	9.9	5.7	8.5	1.6	0.4	<u>10.5</u>

Das Samenöl der Wildtyppflanzen enthielt weniger als 3% VLCFA, während in der Fettsäurezusammensetzung von transgenen Samenölen bis zu 18% 20:1<sup>Δ11</sup> und bis zu 16% 20:1<sup>Δ13</sup> nachweisbar waren. Der Gehalt an 24:1 erreichte in den transgenen Samenölen maximal 0,9%. Während 22 von 44 Napin-KCS-Pflanzen hohe VLCFA-Konzentrationen im Bereich von 11 bis 31% aufwiesen, erreichten nur 2 von 70 FatB4-KCS-Pflanzen einen Gehalt von ungefähr 10% VLCFAs. Allgemein wurde der Anstieg an VLCFAs durch eine Erniedrigung des Gehalts an ungesättigten C18-Fettsäuren begleitet, während der Gehalt an 16:0 und 18:0 kaum verändert war. Die Unterschiede in den VLCFA-Mengen in den Samenölen unabhängiger Transformanten dürften auf verschiedene KCS-Expressionsraten zurückzuführen sein. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß die cDNA aus *B. napus* tatsächlich für eine  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, die beide Elongationsschritte von 18:1 zu 22:1 katalysiert, die aber gegenüber 22:1-CoA als Substrat kaum aktiv ist. Die Einführung nur einer KCS als einziges Condensing-Enzym resultiert in signifikanten Mengen an VLCFAs, was bedeutet, daß die drei anderen Enzyme, die für die Synthese von VLCFAs erforderlich sind, nämlich die oben erwähnten zwei Reduktasen und die Dehydratase, im mikrosomalen Elongationssystem von Drakkar-Pflanzen funktionell vorhanden sein müssen.

Da T2-Samen für jedes T-DNA-Insert aufspalten, konnte man davon ausgehen, daß einzelne, für das T-DNA-Insert homozygoten Samen einen höheren VLCFA-Gehalt aufweisen. Einzelne Kotyledonen von T2-Samen von drei transgenen Pflanzen (T-NK-13, -15 und -20) wurden daher für weitere Analysen der Fettsäurezusammensetzung eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt, die die Verteilung des VLCFA-Gehalts in einzelnen T2-Samen von transgenen LEAR-Drakkar-Pflanzen zeigt. (A) VLCFA-Gehalt von 44 individuellen Samen von Pflanze T-NK-13, (B) VLCFA-Gehalt von 45 individuellen Samen von Pflanze T-NK-15 und (C) VLCFA-Gehalt von 42 individuellen Samen von Pflanze T-NK-20. Wie erwartet wiesen, verursacht durch Gen-Dosis-Effekte, bestimmte Einzelsamen deutlich höhere VLCFA-Gehalte auf, als die, die in gepoolten Samenölfraktionen gemessen wurden. In T2-Samen der Transformante T-NK-13 zeigten 12 von 44 Samen einen fast

- 30 -

zweifach höheren VLCFA-Gehalt als die gepoolten T2-Samen, während 13 Samen das Fettsäuremuster des Wildtyps aufwiesen. Diese Daten zeigen, daß ein T-DNA-Locus in der Primärtransformante von T-NK-13 vorhanden war. Andererseits deutet die Analyse der Transformanten T-NK-15 und T-NK-20 darauf hin, daß diese mindestens drei aktive Kopien  
5 des Transgens enthielten, da nur einer von 45 Samen einen in T-NK-15 und kein einziger Samen von 42 in T-NK-20 einen LEAR-Genotyp zeigte. In Einzelsamen von T-NK-20 konnten bis zu 28% 22:1<sup>413</sup> und 45% VLCFA nachgewiesen werden. Weiter zeigte die Samenölanalyse, daß das Verhältnis von 22:1/20:1 in hohem Maße von der Aktivität des eingeführten KCS-Enzyms abhängig ist, was sich in dem Gesamt-VLCFA-Gehalt in den  
10 Samenölen widerspiegelte. 22:1/20:1-Verhältnisse von > 1 konnten nur bei VLCFA-Gehalten von über 39% beobachtet werden (siehe Abbildung 4 und Abbildung 5). Abbildung 5 zeigt die Fettsäurezusammensetzung von T2-Einzelsamen von transgenen LEAR-Drakkar-Pflanzen, im Vergleich zu Kontrollpflanzen (ck); NK13-4 = Samen einer T-NK-13-Pflanze, NK15-3 = Samen einer T-NK-15-Pflanze, NK20-8 = Samen einer T-NK-20-Pflanze.

15 Um den Gehalt an Erucasäure in Triacylglyceriden auf der Grundlage von HEAR-Phenotypen zu erhöhen, ist es notwendig, nicht nur den Gehalt an 22:1 im CoA-Samenpool zu erhöhen, sondern den 22:1-Gehalt auch in das Öl und das Sink für Fettablagerung zu kanalisieren. Zu diesem Zweck wurden die oben beschriebenen Expressionsvektoren konstruiert, in denen die  
20 Raps-KCS in Kombination mit entweder LPAAT (von *L. douglasii*) mit dem Ziel der Manipulation der Kanalisierung von 22:1 in die sn-2-Position des Samenöls oder GPAT (von *E. coli*) mit dem Ziel der Erhöhung der Sinkkapazität für Fettablagerung, unter der Kontrolle von entweder dem Napin-Promotor oder dem FatB4-Promotor oder dem DC3-Promotor, vorliegt. Die Konstrukte, NKAT (napin-KCS-napin-LPAAT), RSTK (FatB4-KCS-napin-LPAAT), NKDA (napin-KCS-DC3-GPAT= und NKNA (napin-KCS-napin-GPAT) wurden  
25 auf die HEAR-Linie RS306 übertragen. Gepoolte T2-Samen von transgenen RS306-Pflanzen wurden hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzung analysiert, die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. RS306 (ck) identifiziert das Samenöl von RS306-

- 31 -

Kontrollpflanzen, die mit dem leeren Vektor pRE1 transformiert wurden. T-NKAT repräsentiert T2-Samen von NKAT-Pflanzen, T-RSTK T2-Samen von RSTK-Pflanzen, T-NKDA T2-Zellen von NKDA-Pflanzen und T-NKNA T2-Samen von NKAT-Pflanzen.

5

Tabelle 2

<u>Gewichtsprozent von Gesamtfettsäuren TAGSpezies</u>											
	<u>Pflanze</u>	<u>C16:0</u>	<u>C18:0</u>	<u>C18:1</u>	<u>C18:2</u>	<u>C18:3</u>	<u>C20:1</u>	<u>C22:1</u>	<u>C24:1</u>	<u>EiEE</u>	<u>EEE</u>
10	RS306 (ck)	2.5	1.3	15.7	10.8	4.1	6.5	53.7	1.9	-	-
	T-NKAT-1	2.4	1.1	13.3	11.5	5.1	7.0	55.0	1.6	2.8	2.9
	T-NKAT-5	2.3	1.3	13.0	10.1	4.1	6.3	56.7	1.6	3.0	3.7
	T-NKAT-6	2.1	1.0	11.8	10.4	5.3	8.2	55.5	1.5	4.3	4.1
	T-NKAT-7	2.0	0.9	12.7	10.8	4.4	8.3	55.3	1.5	4.2	4.1
15	T-NKAT-14	2.1	0.9	11.9	11.6	5.4	6.1	55.9	1.7	3.8	4.3
	T-RSTK-13	2.1	0.8	11.1	11.1	6.4	5.9	56.7	1.9	4.3	5.6
	T-RSTK-15	2.0	1.0	14.5	10.7	4.1	7.0	55.3	1.6	3.5	2.9
	T-NKDA-5	1.9	1.2	12.1	11.0	4.9	6.4	58.2	2.0	-	-
	T-NKDA-7	2.3	1.2	11.4	10.0	5.1	5.2	59.6	2.3	-	-
20	T-NKDA-15	1.9	1.2	11.1	11.2	4.5	5.8	58.7	2.1	-	-
	T-NKDA-16	1.8	1.2	12.5	11.3	4.9	5.3	58.0	1.9	-	-
	T-NKDA-9	2.1	1.4	11.7	11.2	4.5	5.7	57.0	2.7	-	-
	T-NKDA-4	1.9	0.9	10.0	13.5	5.9	5.1	57.6	1.8	-	-
	T-NKNA-3	1.6	1.0	12.8	11.0	5.0	5.4	58.7	2.0	-	-
	T-NKNA-15	2.0	1.3	10.7	12.4	5.4	4.8	56.3	2.4	-	-
	T-NKNA-20	1.8	1.1	16.1	8.7	4.3	8.1	56.4	1.7	-	-

25

In Tabelle 2 steht „EiEE“ für Triacylglycerid mit einem Eicosensäure-Rest (20:1) und zwei Erucasäure-Resten (22:1). „EEE“ steht für Trierucin, also Triacylglycerid mit drei Erucasäuren.



In T2-Samenölen konnte ein leichter Anstieg im 22:1-Gehalt beobachtet werden, der im Bereich von 2,6 bis 5,9%, verglichen mit dem von RS306-Kontrollpflanzen, lag. Die transgenen Pflanzen akkumulierten 2,9-5,6% Trierucin (EEE) in ihrem Samenöl. Der Anteil von 22:1 an der sn-2-Position im Triacylglycerid (TAG) erreichte 31,7-37,5% in den transgenen Samenölen, während der Anteil in den Kontrollsamensamen weniger als 1% der sn-2-Fettsäuren ausmachte. Diese Ergebnisse zeigten, daß die eingeführten KCS- und LPAAT-Gene in den transgenen Pflanzen funktionell exprimiert wurden. Weiter lassen die in Tabelle 2 gezeigten Daten vermuten, daß maximal ein Gehalt von 22:1 von 60-65% in HEAR-Pflanzen erreicht werden kann.

#### Beispiel 4: Analyse des Raps-KCS-Promotors

Im Rahmen der Vervollständigung des Bereichs des Startkodons der KCS-cDNA wurde, wie oben in Beispiel 1 beschrieben, eine inverse PCR durchgeführt und verschiedene 5'-flankierende Sequenzen der KCS-kodierenden Region mit einer Länge von ~ 1,5 kb aus der genomischen DNA von drei verschiedenen Rapssorten (*B. napus* cv. Askari, Drakkar und RS-Linie 306) isoliert. Sequenzanalysen zeigten, daß die Promotorsequenzen dieser Klone identisch waren, weshalb ein aus Askari isolierter Promotor für die weitere Analyse ausgewählt wurde.

Abbildung 6 zeigt die Sequenz des KCS-Promotors aus Raps (SEQ ID Nr. 2); die Sequenz umfaßt insgesamt 1468 Basen. Das 5'-Ende der gezeigten Sequenz entspricht dem Nukleotid -1429 des KCS-Gens, am 3'-Ende umfaßt die gezeigte Sequenz die Kodons 1 (Methionin) bis 13 (Valin) der KCS-kodierenden Sequenz. Das ATG-Startcodon, die CAAT-Box sowie die TATA-Box sind eingezeichnet.

- 33 -

Ähnlichkeiten der KCS-Promotorregion mit irgendwelchen anderen Promotorsequenzen, die in den Datenbanken erhältlich sind, wurden nicht beobachtet.

Der KCS-Promotor zeigt nicht nur die für samenspezifische Promotoren typischen AT-reichen Elemente (19 Elemente mit einer Länge zwischen 6 und 19 bp im Bereich zwischen -1 und -471), sondern auch verschiedene andere Motive im Bereich -99 bis -137, die eine gewebespezifische Regulation vermuten lassen. Ein RY-Repeat (CATGCATG) liegt zwischen der CAAT-Box und der TATA-Box, und eine E-Box (CACATG) befindet sich direkt neben der TATA-Box.

10

Für die Analyse der funktionellen und gewebespezifischen Expression in transgenen Rapspflanzen wurde die 1,5 kb lange Promotorregion des KCS-Gens mit dem für  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) kodierenden Reportergen uidA (Jefferson *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405; Jefferson *et al.* (1989) EMBO J. 6:3901-3907) in dem binären Vektor pBI101.2 (Clontech, CA; Jefferson *et al.*, *supra*) fusioniert. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine PCR unter Verwendung folgender Primer durchgeführt:

IP6:5'-CTC TCG AAT TCA ATA CAC ATG-3'(sense)

und

20 IP8:5'-TCC CCC GGG TGC TCA GTG TGT GTG TCG-3'(antisense),

wobei IP6 mit der Promotorregion überlappt und der Reverseprimer IP8 eine eingeführte SmaI-Schnittstelle (unterstrichen) für die Klonierung enthielt. Ein 470 bp PCR-Fragment wurde in den Vektor pGEM-T (Promega) ligiert und sequenziert. Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NcoI ausgeschnitten und in das 3'-Ende des mit den gleichen Enzymen geschnittenen Promotors ligiert. Schließlich wurde ein

25

- 34 -

1,5 kb-Promotorfragment mit den Restriktionsenzymen HindIII und SmaI ausgeschnitten und vor die GUS-kodierende Region im pBI101.2 eingefügt. Das hieraus entstandene Konstrukt wurde mit pBnKCS-Prom bezeichnet.

- 5 Das Promotor/GUS-Konstrukt wurde auf *B. napus* RS306 übertragen, und unreife Samen in verschiedenen Entwicklungsstadien und andere Gewebe von transgenen Pflanzen wie Kontrollpflanzen wurden für die GUS-Analyse eingesetzt. Die histochemische GUS-Anfärbung zeigte GUS-Aktivität nur in sich entwickelnden Samen von transgenen Pflanzen, aber nicht in Wurzeln, Stengeln, Blättern, Knospen und Blüten und auch nicht in Organen der
- 10 Kontrollpflanzen. In transgenen Samen war GUS-Expression erstmals am 16. Tag nach der Bestäubung im histochemischen Test sichtbar und wurde bis zum 30. Tag nach Bestäubung stärker, was dem Expressionsmuster des nativen KCS-Gens entspricht. Die quantitative Analyse mittels Chemilumineszenz. bestätigte die histochemischen Ergebnisse. In transgenem Samen, der am 25. und 30. Tag nach Bestäubung geerntet wurde, konnten GUS-Aktivitäten
- 15 von bis zu 180 bzw. 324  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  Protein gemessen werden. Diese Daten beweisen, daß die in Abbildung 6 gezeigte Promotorregion einen neuen, sehr aktiven samenspezifischen Promotor mit hoher Expressionsrate in transgenen Rapspflanzen darstellt.

20 Beispiel 5: Expression von KCS aus *B. napus* in Hefe

- Um die Funktion und Aktivität der durch die verschiedenen isolierten KCS-Gene aus Askari, Drakkar und der RS-Linie 306 kodierten KCS vergleichen zu können, wurden die Gene in den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm INVSC1 (Invitrogen) unter der Kontrolle eines
- 25 Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors exprimiert.

Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen isolierten KCS-Sequenzen in dem Hefeexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen, CA) mit dem GAL1-Promotor fusioniert. Ein 1,7

kb BnKCSa-Fragment aus der cDNA-Bibliothek von *B. napus* cv. Askari wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI ausgeschnitten und in mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pYES2 eingefügt, wodurch der Vektor pYES-BnKCSa entstand. Für die anderen beiden Hefeexpressionskonstrukte wurde ein 0,8 kb HindIII-Fragment von BnKCSa durch das von BnKCSd, also die genomische DNA-Sequenz von *B. napus* cv. Drakkar ersetzt. Das resultierende 1,7 kb chimäre BnKCSd-Gen wurde in EcoRI/XhoI-verdauten Vektor pYES2 eingefügt, wodurch der Vektor pYES-BnKCSd entstand. Für das letzte Konstrukt, nämlich den Hefeexpressionsvektor enthaltend die genomische KCS-Sequenz der Linie RS306 wurde ein 0,9 kb ClaI/EcoRV-Fragment von BnKCSa durch das von BnKCSr (KCS-Sequenz aus der Linie RS306) ersetzt. Die Plasmid-DNAs wurden aus dem *E. coli*-Stamm SCS110 (Stratagene) isoliert. Das entstandene chimäre BnKCSr-Gen (1,7 kb) wurde in EcoRI/XhoI-verdauten pYES2 eingefügt, um pYES-BnKCSr zu ergeben.

INVSC1-Zellen mit dem Plasmid pYES2 ohne Insert wurden als Wildtyp-Kontrolle verwendet. Die Fettsäurezusammensetzung der Hefezellen wurde mittels Gas-Flüssig-Chromatographie (GLC) bestimmt, und die Bestandteile von VLCFAs wurden weiter mittels GLC-MS-Analyse (GLC-Massenspektrometrie) identifiziert. Beträchtliche Mengen an VLCFAs wurden in den transgenen Hefezellen mit der KCS-Sequenz aus Askari gefunden, während die transgenen Hefezellen, die die KCS-Sequenzen aus Drakkar bzw. der RS-Linie exprimierten, Fettsäurezusammensetzungen zeigten ähnlich den Kontrollzellen (siehe auch Tabelle 3). In Zellen mit der KCS-Sequenz aus Askari wurden bis zu 41% VLCFAs in den Fettextrakten detektiert, in denen 22:1-Fettsäuren mit Doppelbindung in entweder der Position  $\Delta 15$  oder  $\Delta 13$  vorherrschten, aber auch gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren mit mehr als 22 C-Atomen ebenfalls in nennenswerten Mengen detektiert werden konnten. Diese Daten zeigen, daß das KCS-Gen von Askari, anders als die KCS-Gene von Drakkar oder der RS306-Linie, in Hefe funktionell exprimiert wurde und mit den Bestandteilen des Hefe-Elongase-Komplexes effektiv zusammenwirkte. Weiter zeigen die Daten, daß diese in Hefe exprimierte KCS eine relativ breite Acyl-CoA-Spezifität besitzt.

Wie in Abbildung 7A dargestellt, verwendet die KCS nicht nur 18:1<sup>Δ9</sup>-, sondern auch 16:1<sup>Δ9</sup>- Acylgruppen als Substrat. Da Hefezellen zweimal mehr 16:1<sup>Δ9</sup> als 18:1<sup>Δ9</sup> akkumulieren, scheint die KCS beide Acylgruppen in ähnlichem Ausmaß zu verwenden. Zusätzlich zeigte  
5 die Fettsäureanalyse von transgenen Hefezellen, daß die eingeführte KCS aus Askari die Elongation von 18:0 derart bewirkt, daß 26:0 als Hauptprodukt gebildet wird. Somit scheint die Fähigkeit der Askari-KCS, C20- und C22-Acylgruppen zu verlängern, deutlich höher mit gesättigten als mit einfach ungesättigten Acyl-CoA-Thioestern zu sein. Insgesamt zeigen die Daten, daß die KCS aus Askari äußerst aktiv in Hefe ist und zudem in der Lage ist, vier bis  
10 fünf Elongationsschritte in Hefe zu katalysieren. Hier scheint die KCS aus *Brassica napus* der KCS aus *A. thaliana*, die nur zwei bis drei Elongationsschritte katalysiert, deutlich überlegen zu sein.

Wie oben erwähnt, konnte kein VLCFA-Gehalt in Hefezellen, transformiert mit KCS aus  
15 Drakkar, detektiert werden. Wie bereits erwähnt, zeigen die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen nur einen Unterschied in Position 282, nämlich daß Serin in Drakkar in dieser Position durch Phenylalanin ersetzt ist. Dieser Aminosäureaustausch könnte ein katalytisch inaktives Protein hervorrufen und dadurch den LEAR-Phenotyp der Sorte Drakkar bewirken. Dies wird auch durch Daten der Analyse des Samenöls von transgenen Drakkar-Pflanzen  
20 bestätigt, die zeigen, daß der Phenotyp mit höherem Erucasäuregehalt durch Einführung des KCS-Gens aus Askari wiederhergestellt werden kann.

Die untenstehende Tabelle 3 zeigt die Fettsäurezusammensetzung von Wildtyp-Kontroll- und transformierten Hefezellen. YES2 = Wildtyp-Kontrolle; BnKCSa = Hefezellen, transformiert  
25 mit Askari BnKCS; BnKCSd = Hefezellen, transformiert mit Drakkar BnKCS; BnKCSr = Hefezellen, transformiert mit RS306 BnKCS. Die Werte geben den Gehalt an einer bestimmten Fettsäure als prozentualen Anteil (w/w) des Gesamtfettsäuregehalts wieder.

Tabelle 3

	Fettsäure	YES2	BnKCSa	BnKCSd	BnKCSr
5	16:0	22.83	8.51	23.78	23.08
	16:1 <sup>Δ9</sup>	45.79	31.34	44.90	44.27
	18:0	6.20	2.68	7.06	6.61
	18:1 <sup>Δ9</sup>	24.00	9.17	22.97	24.55
	18:1 <sup>Δ11</sup>	-	1.93	-	-
10	20:0	-	1.87	-	-
	20:1 <sup>Δ11</sup>	-	0.38	-	-
	22:0	-	2.28	-	-
	22:1 <sup>Δ13</sup>	-	6.87	-	-
	22:1 <sup>Δ15</sup>	-	11.57	-	-
15	24:0	-	3.53	-	-
	24:1 <sup>Δ15</sup>	-	0.86	-	-
	24:1 <sup>Δ17</sup>	-	3.21	-	-
	26:0	-	8.40	-	-
	26:1 <sup>Δ17</sup>	-	0.30	-	-
	26:1 <sup>Δ19</sup>	-	1.79	-	-

- 20 Die nachstehende Abbildung 7 enthält Daten der Expression von BnKCSa in Hefe, wobei (A) verschiedene Synthesewege für verschiedene VLCFAs zeigt; (B) die Fettsäurezusammensetzungen von Hefezellen, transformiert mit BnKCSa, zeigt, und (C) die erhöhten Anteile verschiedener VLCFA-Spezies am Gesamtfettsäuregehalt wiedergibt.
- 25 Lipidextraktionen und Fettsäureanalysen wurden nach Standardverfahren durchgeführt, siehe z.B. Browse et al. (1986) Anal. Biochem. 152: 141-145, wobei die Fettsäuremethylester weiter durch GC-MS-Analyse unter Verwendung ihrer Nikotinat- und Di-O-

Trimethylsilylether-Derivate identifiziert wurden (Dommes et al. (1976) J. Chromatogr. Sci. 14: 360-366; Murata et al. (1978) J. Lipid Res. 19: 172-176).

5    Beispiel 6:    Fettsäurefütterungsexperimente mit transgenen Hefezellen, die die KCS aus *B. napus* exprimieren

Um die Substratspezifitäten der in Hefezellen exprimierten KCS aus *B. napus* zu analysieren, wurden Fütterungsversuche mit verschiedenen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren  
10 durchgeführt. Für diese Versuche wurden die transgenen Hefezellen, wie in Beispiel 5 beschrieben, entwickelt und kultiviert. Bei einer optischen Dichte der Hefekulturen von 0,5 wurde die Genexpression durch Zugabe von 2% Galactose induziert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Kulturen ebenfalls in Gegenwart von 0,1% Tergitol NP-40 mit verschiedenen Fettsäuren in einer Endkonzentration von 0,2 mM versetzt und 24 h bei 30°C weiter kultiviert  
15 (Kontrolle ohne Fettsäurezusatz). Schließlich wurden die Zellen geerntet und für die Fettsäureanalyse verwendet.

Durch Kontrollexperimente wurde sichergestellt, daß Hefezellen selbst nicht in der Lage sind, die eingesetzten Substrate 18:2<sup>9,12</sup>, 18:3<sup>9,12,15</sup>, 18:3<sup>6,9,12</sup>, 20:3<sup>8,11,14</sup> und 20:4<sup>5,8,11,14</sup> zu  
20 elongieren. Überraschenderweise wurden in solchen Hefezellen, in denen die KCS aus *B. napus* exprimiert wurde, je nach eingesetztem Substrat verschiedene Elongationsprodukte gefunden, die in Tabelle 4 unten aufgeführt sind. Diese gefundenen Elongationsprodukte sind auf die Aktivität der eingeführten KCS aus *B. napus* zurückzuführen.

- 39 -

Tabelle 4

Substrat	Substratakkumulation		Elongationsprodukte				Summe
	% Gesamtfettsäuren		% Gesamtfettsäuren				Elongationsprodukte
							(%)
			20:X	22:X	24:X	26:X	
18:2 <sup>9,12</sup>	45,7	2,1	3,1	0,1	0,1		5,4
18:3 <sup>9,12,15</sup>	56,4	2,3	2,3	0,3	-		4,9
18:3 <sup>6,9,12</sup>	61,3	0,7	0,1	0,1	0,4		1,3
20:3 <sup>8,11,14</sup>	34,1	-	3,6	0,2	0,5		4,3
20:4 <sup>5,8,11,14</sup>	31,8	-	2,2	0,1	0,6		2,9

Aus den in Tabelle 4 zusammengefaßten Daten wird deutlich, daß die in den Hefezellen  
 5 exprimierten KCS aus *B. napus* (BnKCSa) die exogen zugesetzten Fettsäuren, 18:2<sup>9,12</sup>,  
 18:3<sup>9,12,15</sup>, 18:3<sup>6,9,12</sup>, 20:3<sup>8,11,14</sup>, 20:4<sup>5,8,11,14</sup>, die von den Hefezellen aus dem Medium  
 aufgenommen wurden, als Substrate nutzt und um 6 bis 8 C-Atome verlängert. Die mit 20:X,  
 22:X, 24:X und 26:X bezeichneten Produkte entsprechen den erwarteten Elongations-  
 produkten. Die korrekte Lage der Doppelbindungen wurde durch GC/MS sichergestellt.



## Ansprüche

1. Nukleinsäuresequenz,  
dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS) aus *Brassica napus* kodiert.  
5
2. Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1,  
umfassend SEQ:ID No. 1 oder Teile davon oder kodierend für ein Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder Teile davon.  
10
3. Promotorregion,  
dadurch gekennzeichnet, daß sie natürlicherweise die Expression eines  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Gens kontrolliert.
- 15 4. Promotorregion gemäß Anspruch 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß sie natürlicherweise die Expression eines pflanzlichen  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Gens kontrolliert.
5. Promotorregion gemäß Anspruch 3 oder 4,  
20 dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Brassicaceen, insbesondere aus *Brassica napus* stammt.
6. Promotorregion gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5,  
umfassend SEQ ID Nr. 2 oder Teile davon, die die Transkription einer operativ verknüpften kodierenden oder nicht kodierenden Region gewährleisten.  
25
7. Chimäres Gen,  
dadurch gekennzeichnet, daß es eine Promotorregion gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6, operativ mit einer kodierenden Region verknüpft, umfaßt.

8. Nukleinsäuremolekül,  
dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz, eine Promotorregion oder ein  
5 chimäres Gen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt.
9. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 operativ  
verknüpft mit einem in Pflanzen aktiven, insbesondere einem samenspezifischen Promotor  
10 umfaßt.
10. Transgene Pflanzen,  
dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleinsäuresequenz, eine Promotorregion, ein  
chimäres Gen oder ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der vorangehenden Ansprüche  
15 enthalten, sowie Teile dieser Pflanzen und deren Vermehrungsmaterial, wie Protoplasten,  
Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen oder Stecklinge, sowie die Nachkommen dieser  
Pflanzen.
11. Pflanzen gemäß Anspruch 10,  
20 bei denen es sich um Ölsaaten, insbesondere Raps, Rüpsen, Sonnenblume, Sojabohne,  
Erdnuß, Kokospalme, Ölpalme, Baumwolle, Lein handelt.
12. Verfahren zur Bereitstellung samenspezifischer Expression einer kodierenden Region in  
Pflanzensamen, umfassend die Schritte:
- 25 a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine Promotorregion gemäß einem der  
Ansprüche 3 bis 6 in operativer Verknüpfung mit einer kodierenden Region vorliegt,  
b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und

c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

13. Verfahren zur Verschiebung der Kettenlänge von Fettsäuren hin zu länger-kettigen  
5 Fettsäuren in transgenen Pflanzen, insbesondere in Ölsaaten, umfassend die Schritte:
- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in Pflanzen, insbesondere in Samengewebe aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 vorliegt,
  - b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und
  - 10 c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der Pflanzen.

14. Verfahren zur Erhöhung des Verhältnisses von 22:1-Fettsäuren zu 20:1-Fettsäuren in transgenen Pflanzen, insbesondere in Ölsaaten, umfassend die Schritte:
- 15 a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in Pflanzen, insbesondere in Samengewebe aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 vorliegt,
  - b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf pflanzliche Zellen und
  - c) Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der  
20 Pflanzen.

15. Verfahren zur Herstellung von länger-kettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Elongation kürzer-kettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Mikroorganismen und Pflanzenzellen durch (i) Elongation von natürlicherweise vorkommenden mehrfach  
25 ungesättigten Fettsäuren oder (ii) Elongation von aus der Umgebung aufgenommenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, umfassend die Schritte:
- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in dem Mikroorganismus bzw. der Pflanzenzelle aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer

- Nukleinsäuresequenz vorliegt, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf Mikroorganismen oder pflanzliche Zellen,
- 5 c) im Falle von pflanzlichen Zellen ggf. Regeneration vollständig transformierter Pflanzen, und
- d) falls erwünscht, Vermehrung der erzeugten transgenen Organismen.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert, die Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 ist.
- 10 17. Verfahren zur Herstellung von längerkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Elongation kürzerkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Mikroorganismen und
- 15 Pflanzenzellen durch Elongation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die in dem Mikroorganismus bzw. der Pflanzenzelle aufgrund der Expression eines oder mehrerer eingeführten Desaturase- oder/und Elongase-Gene erzeugt werden, umfassend die Schritte:
- a) Herstellung einer Nukleinsäuresequenz, in der eine in dem Mikroorganismus bzw. der Pflanzenzelle aktive Promotorregion in operativer Verknüpfung mit einer
- 20 Nukleinsäuresequenz vorliegt, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert,
- b) Übertragung der Nukleinsäuresequenz aus a) auf Mikroorganismen oder pflanzliche Zellen,
- 25 c) im Falle von pflanzlichen Zellen ggf. Regeneration vollständig transformierter Pflanzen, und
- d) falls erwünscht, Vermehrung der erzeugten transgenen Organismen.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase codiert, die Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 ist.
- 5 19. Verfahren zur Änderung der  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase-Aktivität in transgenen Pflanzen durch Übertragung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 auf pflanzliche Zellen, falls erwünscht mit anschließender Regeneration vollständig transformierter Pflanzen und, falls erwünscht, Vermehrung der erzeugten transgenen Pflanzen.
- 10 20. Verwendung einer Promotorregion gemäß einem der Ansprüche 3 bis 6 zur Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzenteilen und/oder Pflanzenprodukten mit veränderter Genexpression.
- 15 21. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzenteilen und/oder Pflanzenprodukten mit einem gegenüber Wildtyppflanzen erhöhten Verhältnis von 22:1-Fettsäuren zu 20:1-Fettsäuren.
- 20 22. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung von transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzenteilen und/oder Pflanzenprodukten mit einem gegenüber Wildtyppflanzen hin zu länger-kettigen Fettsäuren verschobenen Fettsäuremuster.
- 25 23. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-Synthase kodiert, zur Herstellung transgener Mikroorganismen oder Pflanzenzellen mit einem gegenüber den Ausgangsformen zu länger-kettigen Fettsäuren verschobenen Muster an mehrfach ungesättigten Fettsäuren.
24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei es sich bei der Nukleinsäuresequenz um eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder 2 handelt.

Abbildung 1 (SEQ ID Nr.1)

```

                                agcgtaacggaccacaaaaga -21
ggatccatacaaatacatctcatcgcttcctctactattctccgacacacacactgagca -81
GPI -
M T S I N V K L L Y H Y V I T N L F N L
atgacgttcCATTAAAGCTCCTTTACCATTACGTCATAACCAACCTTTTCAACCTT 60
                                - IP1
C F F P L T A I V A G K A Y R L T I D D
TGCTTCTTTCCGTTAACGGCGATCGTCGCCGAAAAGCCTATCGGCTTACCATAGACGAT 120
L H H L Y Y S Y L Q H N L I T I A P L F
CTTCACCACTTATACTATTCTATCTCCAACACAACCTCATAACCATCGCTCCACTCTTT 180
A F T V F G S V L Y I A T R P K P V Y L
GCCTTCACCGTTTTTCGGTTCGGTTCTCTACATCGCAACCCGGCCCAAACCGGTTTACCTC 240
V E Y S C Y L P P T H C R S S I S K V M
GTTGAGTACTCATGCTACCTTCCACCAACGCATTGTAGATCAAGTATCTCCAAGGTCATG 300
D I F Y Q V R K A D P S R N G T C D D S
GATATCTTTTATCAAGTAAGAAAAGCTGATCCTTCTCGGAACGGCACGTGCGATGACTCG 360
S W L D F L R K I Q E R S G L G D E T H
TCGTGGCTTGACTTCTTGAGGAAGATTCAAGAACGTTTCAAGTCTAGGCGATGAAACTCAC 420
G P E G L L Q V P P R K T F A A A R E E
GGGCCCCGAGGGGCTGCTTCAGGTCCCTCCCCGGAAGACTTTTGCGGGCGGCGGTGAAGAG 480
T E Q V I I G A L E N L F K N T N V N P
ACGGAGCAAGTTATCATTGGTGCGCTAGAAAATCTATTCAAGAACACCAACGTTAACCTT 540
K D I G I L V V N S S M F N P T P S L S
AAAGATATAGGTATACTTGTGGTGAACCTCAAGCATGTTTAATCCAACCTCCATCGCTCTCC 600
A M V V N T F K L R S N V R S F N L G G
GCGATGGTCGTTAACACTTTCAAGCTCCGAAGCAACGTAAGAAGCTTTAACCTTGGTGGC 660
V IP3 -
M G C S A G V I A I D L A K D L L H V H
ATGGGTTGTAGTGCCGGCGTTATAGCCATTGATCTAGCAAAGGACTTGTGTCATGTCCAT 720
K N T Y A L V V S T E N I T Y N I Y A G
AAAAATACGTATGCTCTTGTGGTGAGCAGAGAGAACATCACTTATAACATTTACGCTGGT 780
D N R S M M V S N C L F R V G G A A I L
GATAATAGGTCCATGATGGTTTCAAATTGCTTGTTCGTGTTGGTGGGGCCGCTATTTTG 840
L S N K P G D R R R S K Y E L V H T V R
CTCTCCAACAAGCCTGGAGATCGTAGACGGTCCAAGTACGAGCTAGTTACACGCGTTTCA 900

```

2/8

## Abbildung 1 Fortsetzung

T H T G A D D K S F R C V Q Q G D D E N  
ACGCATACCGGAGCTGACGACAAGTCTTTTCGTTGCGTGCAACAAGGAGACGATGAGAAC 960

G K I G V S L S K D I T D V A G R T V K  
GGCAAAATCGGAGTGAGTTTGTCCAAGGACATAACCGATGTTGCTGGTCGAACGGTTAAG 1020

K N I A T L G P L I L P L S E K L L F 'F  
AAAAACATAGCAACGTTGGGTCCGTTGATTCTTCCGTTAAGCGAGAACTTCTTTTTTC 1080

V T F M G K K L F K D K I K H Y Y V P D  
GTTACCTTCATGGGCAAGAACTTTTCAAAGATAAAATCAAACATTACTACGTCCCGGAT 1140

F K L A I D H F C I H A G G R A V I D V  
TTCAAACCTTGCTATTGACCATTTTTGTATACATGCCGGAGGCAGAGCCGTGATTGATGTG 1200

L E K N L A L A P I D V E A S R S T L H  
CTAGAGAAGAACCTAGCCCTAGCACCGATCGATGTAGAGGCATCAAGATCAACGTTACAT 1260

R F G N T S S S S I W Y E L A Y I E A K  
AGATTTGGAAACACTTCATCTAGCTCAATATGGTATGAGTTGGCATACATAGAAGCAAAA 1320

G R M K K G N K V W Q I A L G S G F K C  
GGAAGGATGAAGAAAGTAATAAAGTTTGGCAGATTGCTTTAGGGTCAGGCTTTAAGTGT 1380

N S A V W V A L N N V K A S T N S P W E  
AACAGTGCAGTTTGGGTGGCTCTAAACAATGTCAAAGCTTCGACAAATAGTCCTTGGGAA 1440

H C I D R Y P V K I D S D S G K S E T R  
CACTGCATCGACAGATACCCGGTCAAATGATTCTGATTGAGTAAGTCAGAGACTCGT 1500

V Q N G R S \*

GTCCAAAACGGTCGGTCTAAATAATGATGTTTGCTCTCTTTTCGTTTCTTTTATTGT 1560

ATAATAATTTGATGGCTACGATGTTTCTCTGTTTGTATGAATAAAGAATGCAATGGTG 1620

- GP2

TTCTAGTATTTGATTGTTTACATGTATGTATCTTATTTACATGAAATTTTAAACGC 1680

b3,

CTAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1704

3/8

Abbildung 2

BnKCSa :	.....*	20	.....*	40	.....*	
BnKCSd :	.....					54
BnKCSr :	.....					54
	MTSVNVKLLYHYVITNLFNLCFFPLTAIVAGKAYRLTIDDLHHLYSYLQHNLI					54
BnKCSa :	.....60	.....*	80	.....*	100	
BnKCSd :	.....					108
BnKCSr :	.....					108
	TIAPLFAFTVFGSVLYIATRPKPVYLVEYSCYLPPTHCRSSISKVMDIFYQVRK					108
BnKCSa :	.....*	120	.....*	140	.....*	160
BnKCSd :	.....					162
BnKCSr :	.....					162
	ADPSRNGTCDSSWLDFLRKIQERSGLGDETHGPEGLLQVPPRKTFAAAREETE					162
BnKCSa :	.....*	180	.....*	200	.....*	
BnKCSd :	.....					216
BnKCSr :	.....					216
	QVIIGALENLFKNTNVNPKDIGILVVNSSMFNPTPSLSAMVVNTFKLRSNVRSF					216
BnKCSa :	.....220	.....*	240	.....*	260	.....*
BnKCSd :	.....					270
BnKCSr :	.....					270
	NLGGMGCSAGVIAIDLAKDLLHVHKNTYALVVSTENITYNIYAGDNRSMMVSN					270
BnKCSa :	.....280	.....*	300	.....*	320	
BnKCSd :	.....					324
BnKCSr :	.....					324
	LFRVGGAAILLSNKPgDRRRSKYELVHTVRTHTGADDKSFRVQOGDDENGKIG					324
BnKCSa :	.....*	340	.....*	360	.....*	3
BnKCSd :	.....					378
BnKCSr :	.....					378
	VLSKDITDVAGRTVKKNIAITLGPLILPLSEKLLFFVTFMGKKLFKDKIKHYV					378
BnKCSa :	.....80	.....*	400	.....*	420	.....*
BnKCSd :	.....					432
BnKCSr :	.....					432
	PDFKLAIDHFCIHAGGrAVIDVLEKNLaLAPIDVEASRSTLHRFGNTSSSSIWY					432
BnKCSa :	.....440	.....*	460	.....*	480	
BnKCSd :	.....					486
BnKCSr :	.....					486
	ELAYIEAKGRMKKGKVKVWQIALGSGFKCNSAVVVALNNVKASTNSPWEHCIDRY					486
BnKCSa :	.....*	500				
BnKCSd :	.....					506
BnKCSr :	.....					506
	PVKIDSDSGKSETRVQNGRS					506



Abbildung 3.

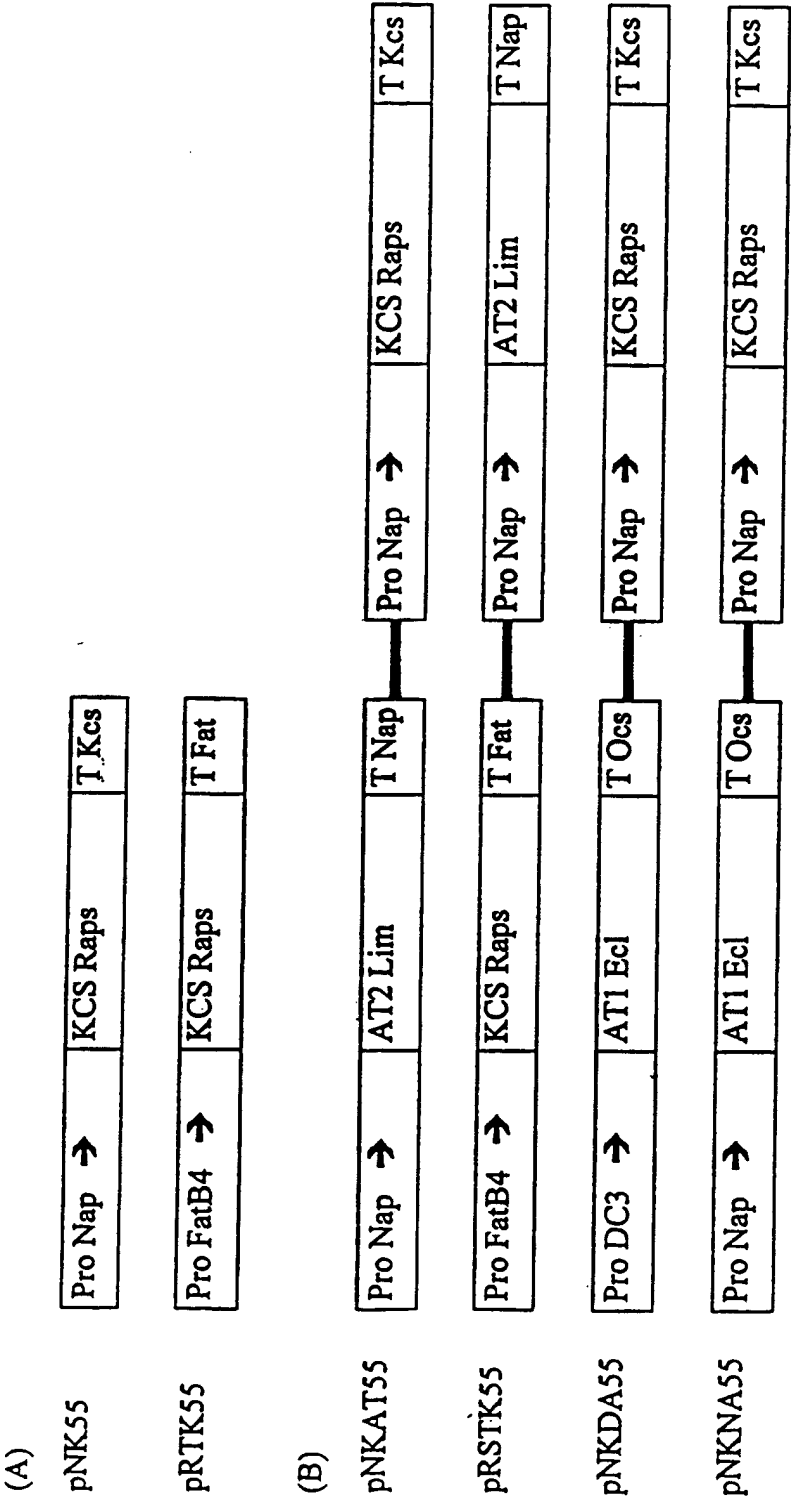
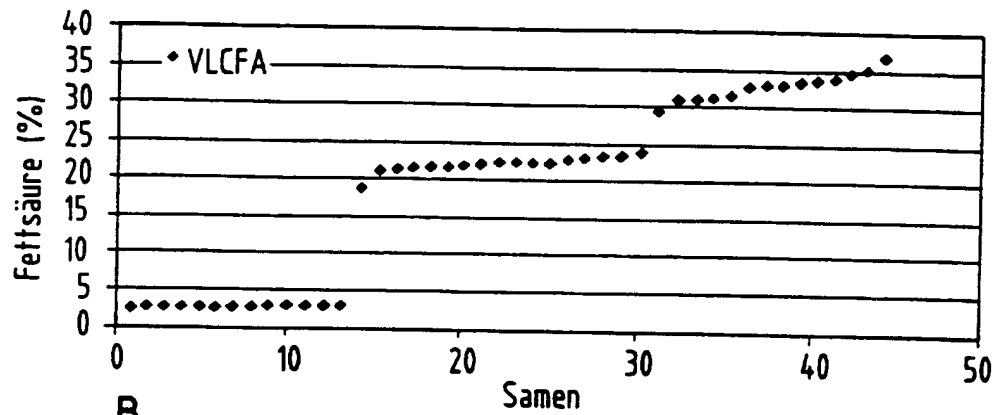


Abbildung 4

A



B



C

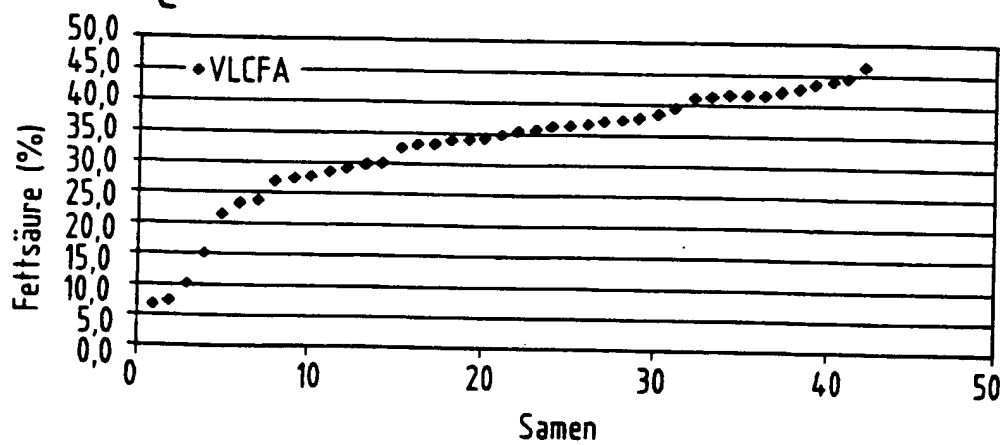


Abbildung 5

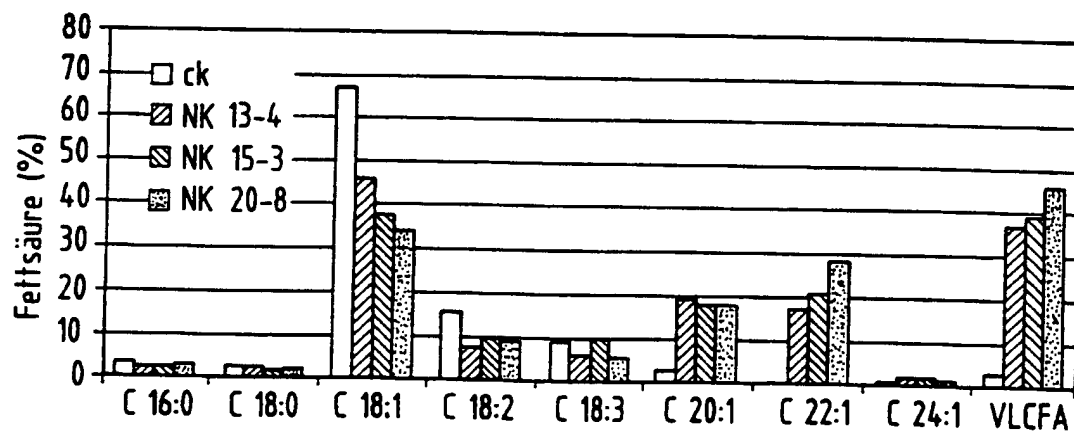


Abbildung 6 (SEQ ID Nr. 2)

```

AAGCTTT ACAACGATAC ACAAACTTA TAACCGTAAT
CACCATTTCAT TAACTTAACT ACTATCACAT GCATTTCATGA ATTGAAACGA GAAGGATGTA
AATAGTTGGG AAGTTATCTC CACGTTGAAG AGATCGTTAG CGAGAGCTGA AAGACCGAGG
GAGGAGACGC CGTCAACACG GACAGAGTCG TCGACCCTCA CATGAAGTAG GAGGAATCTC
CGTGAGGAGC CAGAGAGACG TCTTTGGTCT TCGGTTTCGA TCCTTGATCT GACGGAGAAG
ACGAGAGAAG TGCGACTGGA CTCCGTGAGG ACCAACAGAG TCGTCCTCGG TTTCGATCGT
CGGTATTGGT GGAGAAGGCG GAGGAATCTC CGTGACGAGC CAGAGAGATG TCGTCGGTCT
TCGGTTTCGA TCCTTGATCT GACGGAGAAG ACGAGAGAAG TGCGACGAGA CTCCGTGAGG
ACCAACAGAG TTGTCTCGG TTTTCGATCGT CGGTTTCGGC GGAGAAGGCG GAGGAATCTC
CGTGAGGAGC CAGAGAGACG TCGTTGGTCT TCGGTTTCGA TCCTTGATCT GATGGAGAAG
ACGAGACAAG TGGGACGAGA CTCAACGACG GAGTCAGAGA CGTCGTGGT CTTCCGGTTTC
GGCCGAGAAG GCGGAGTCGG TCTTCGGTTT CGGCCGAGAA GGCGGAGGAG ACGTCTTCGA
TTTGGGTCTC TCCTCTTGAC GAAGAAAACA AAGAACACGA GAAATAATGA GAAAGAGAAC
AAAAGAAAAA AAAATAAAAA TAAAAATAAA ATTTGGTCCT CTTATGTGGT GACACGTGGT
TTGAAACCCA CCAAATAATC GATCACAAAA AACCTAAGTT AAGGATCGGT AATAACCTTT
CTAATTAATT TTGATTTAAT TAAATCACTC TTTTATTTA TAAACCCAC TAAATTATGC
GATATTGATT GTCTAAGTAC AAAAATTCTC TCGAATTCAA TACACATGTT TCATATATTT
AGCCCTGTTT ATTTAATATT ACTAGCGCAT TTTTAATTTA AAATTTTGTA AACTTTTTTG
GTCAAAGAAC ATTTTTTTTAA TTAGAGACAG AAATCTAGAC TCTTTATTTG GAATAATAGT
AATAAAGATA TATTAGGCAA TGAGTTTATG ATGTTATGTT TATATAGTTT ATTTCATTTT
AAATTGAAAA GCATTATTTT TATCGAAATG AATCTAGTAT ACAATCAATA TTTATGTTTT
TTCATCAGAT ACTTTCCTAT TTTTGGCAC CTTTCATCGG ACTACTGATT TATTTCAATG
TGTATGCATG CATGAGCATG AGTATACACA TGTCTTTTAA AATGCATGTA AAGCGTAACG
GACCACAAAA GAGGATCCAT ACAAATACAT CTCATCGCTT CCTCTACTAT TCTCCGACAC
ACACACTGAG CAATGACGTC CATTAACGTA AAGCTCCTTT ACCATTACGT C

```

Abbildung 7 <sup>8/8</sup>

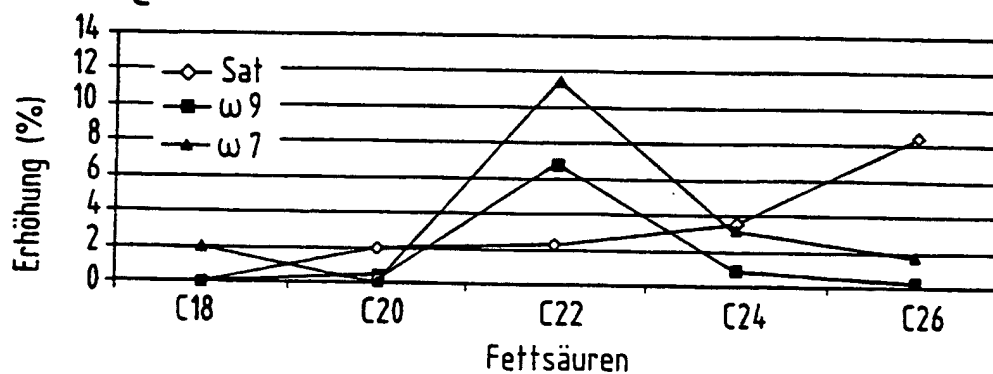
A

16:0	→	16:1 <sup>Δ9</sup>
↓		↓ EL ω7
18:0	→	18:1 <sup>Δ9</sup>
↓		↓ EL ω9
20:0		20:1 <sup>Δ11</sup>
↓		↓
22:0		22:1 <sup>Δ13</sup>
↓		↓
24:0		24:1 <sup>Δ15</sup>
↓		↓
26:0		26:1 <sup>Δ17</sup>
		26:1 <sup>Δ19</sup>

B

	Gesättigt	ω9	ω7
C16	8.51	-	31.34
C18	2.68	9.17	1.93
C20	1.87	0.38	0.00
C22	2.28	6.87	11.57
C24	3.53	4.86	3.21
C26	8.40	0.30	1.79

C



## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Gesellschaft fuer Erwerb und Verwertung von Schutzrechten -  
GVS mbH  
(B) STRASSE: Kaufmannstr. 71-73  
(C) ORT: Bonn  
(E) LAND: Deutschland  
(F) POSTLEITZAHL: 53115 Bonn

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Elongasepromotoren für gewebespezifische  
Expression von Transgenen in Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 3

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1785 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Doppelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AGCGTAACGG ACCACAAAAG AGGATCCATA CAAATACATC TCATCGCTTC CTCTACTATT	60
CTCCGACACA CACACTGAGC AATGACGTCC ATTAACGTAA AGCTCCTTTA CCATTACGTC	120
ATAACCAACC TTTTCAACCT TTGCTTCTTT CCGTTAACGG CGATCGTCGC CGGAAAAGCC	180
TATCGGCTTA CCATAGACGA TCTTCACCAC TTATACTATT CCTATCTCCA ACACAACCTC	240
ATAACCATCG CTCCACTCTT TGCCTTCACC GTTTTCGGTT CGGTTCTCTA CATCGCAACC	300
CGGCCCAAAC CGGTTTACCT CGTTGAGTAC TCATGCTACC TTCCACCAAC GCATTGTAGA	360
TCAAGTATCT CCAAGGTCAT GGATATCTTT TATCAAGTAA GAAAAGCTGA TCCTTCTCGG	420
AACGGCACGT GCGATGACTC GTCGTGGCTT GACTTCTTGA GGAAGATTCA AGAACGTTCA	480
GGTCTAGGCG ATGAAACTCA CGGGCCCGAG GGGCTGCTTC AGGTCCCTCC CCGGAAGACT	540
TTTGCGGCGG CGCGTGAAGA GACGGAGCAA GTTATCATTG GTGCGCTAGA AAATCTATTC	600
AAGAACACCA ACGTTAACCC TAAAGATATA GGTATACTTG TGGTGAACCTC AAGCATGTTT	660
AATCCAACCTC CATCGCTCTC CGCGATGGTC GTTAACACTT TCAAGCTCCG AAGCAACGTA	720
AGAAGCTTTA ACCTTGGTGG CATGGGTTGT AGTGCCGGCG TTATAGCCAT TGATCTAGCA	780

AAGGACTTGT TGCATGTCCA TAAAAATACG TATGCTCTTG TGGTGAGCAC AGAGAACATC	840
ACTTATAACA TTTACGCTGG TGATAATAGG TCCATGATGG TTTCAAATTG CTTGTTCCGT	900
GTTGGTGGGG CCGCTATTTT GCTCTCCAAC AAGCCTGGAG ATCGTAGACG GTCCAAGTAC	960
GAGCTAGTTC ACACGGTTCG AACGCATACC GGAGCTGACG ACAAGTCTTT TCGTTGCGTG	1020
CAACAAGGAG ACGATGAGAA CGGCAAAATC GGAGTGAGTT TGTCCAAGGA CATAACCGAT	1080
GTTGCTGGTC GAACGGTTAA GAAAAACATA GCAACGTTGG GTCCGTTGAT TCTTCCGTTA	1140
AGCGAGAAAC TTCTTTTTTT CGTTACCTTC ATGGGCAAGA AACTTTTCAA AGATAAAATC	1200
AAACATTACT ACGTCCCGGA TTTCAAACCTT GCTATTGACC ATTTTGTAT ACATGCCGGA	1260
GGCAGAGCCG TGATTGATGT GCTAGAGAAG AACCTAGCCC TAGCACCGAT CGATGTAGAG	1320
GCATCAAGAT CAACGTTACA TAGATTGGA AACACTTCAT CTAGCTCAAT ATGGTATGAG	1380
TTGGCATAACA TAGAAGCAA AGGAAGGATG AAGAAAGGTA ATAAAGTTTG GCAGATTGCT	1440
TTAGGGTCAG GCTTTAAGTG TAACAGTGCA GTTTGGGTGG CTCTAAACAA TGTCAAAGCT	1500
TCGACAAATA GTCCTTGGGA AACTGTCATC GACAGATACC CGGTCAAAT TGATTCTGAT	1560
TCAGGTAAGT CAGAGACTCG TGTCCAAAC GGTGCTCCT AATAAATGAT GTTTGCTCTC	1620
TTTCGTTTCT TTTTATTGT TATAATAATT TGATGGCTAC GATGTTTCTC TTGTTTGTTA	1680
TGAATAAAGA ATGCAATGGT GTTCTAGTAT TTGATTGTTT TACATGTATG TATCTCTTAT	1740
TTACATGAAA TTTTAAACG CCTAGGAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	1785

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1468 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang.
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

AAGCTTTACA ACGATACACA AAACCTTATAA CCGTAATCAC CATTATTAA CTTAACTACT	60
ATCACATGCA TTCATGAATT GAAACGAGAA GGATGTAAAT AGTTGGGAAG TTATCTCCAC	120
GTTGAAGAGA TCGTTAGCGA GAGCTGAAAG ACCGAGGGAG GAGACGCCGT CAACACGGAC	180
AGAGTCGTCTG ACCCTCATAT GAAGTAGGAG GAATCTCCGT GAGGAGCCAG AGAGACGTCT	240
TTGGTCTTCG GTTTCGATCC TTGATCTGAC GGAGAAGACG AGAGAAGTGC GACTGGACTC	300
CGTGAGGACC AACAGAGTCG TCCTCGGTTT CGATCGTCGG TATTGGTGA GAAGCGGAG	360
GAATCTCCGT GACGAGCCAG AGAGATGTCG TCGGTCCTCG GTTTCGATCC TTGATCTGAC	420
GGAGAAGACG AGAGAAGTGC GACGAGACTC CGTGAGGACC AACAGAGTTG TCCTCGGTTT	480

3

CGATCGTCGG TTTCCGGCGGA GAAGGCGGAG GAATCTCCGT GAGGAGCCAG AGAGACGTCG	540
TTGGTCTTCG GTTTCGATCC TTGATCTGAT GGAGAAGACG AGACAAGTGG GACGAGACTC	600
AACGACGGAG TCAGAGACGT CGTCGGTCTT CGGTTTCGGC CGAGAAGGCG GAGTCGGTCT	660
TCGGTTTCGG CCGAGAAGGC GGAGGAGACG TCTTCGATT TGGTCTCTCC TCTTGACGAA	720
GAACAACAAAG AACACGAGAA ATAATGAGAA AGAGAACAAA AGAAAAAAAA ATAAAAATAA	780
AAATAAAATT TGGTCCTCTT ATGTGGTGAC ACGTGGTTTG AAACCCACCA AATAATCGAT	840
CACAAAAAAC CTAAGTTAAG GATCGGTAAT AACCTTTCTA ATTAATTTTG ATTTAATTAA	900
ATCACTCTTT TTATTTATAA ACCCCACTAA ATTATGCGAT ATTGATTGTC TAAGTACAAA	960
AATTCTCTCG AATTCAATAC ACATGTTTCA TATATTTAGC CCTGTTCATT TAATATTACT	1020
AGCGCATTTT TAATTTAAAA TTTTGTAAC TTTTTTGGTC AAAGAACATT TTTTAAATTA	1080
GAGACAGAAA TCTAGACTCT TTATTTGGAA TAATAGTAAT AAAGATATAT TAGGCAATGA	1140
GTTTATGATG TTATGTTTAT ATAGTTTATT TCATTTTAAA TTGAAAAGCA TTATTTTAT	1200
CGAAATGAAT CTAGTATACA ATCAATATTT ATGTTTTTTC ATCAGATACT TTCCTATTTT	1260
TTGGCACCTT TCATCGGACT ACTGATTTAT TTCAATGTGT ATGCATGCAT GAGCATGAGT	1320
ATACACATGT CTTTAAAAAT GCATGTAAAG CGTAACGGAC CACAAAAGAG GATCCATACA	1380
AATACATCTC ATCGCTTCCT CTACTATTCT CCGACACACA CACTGAGCAA TGACGTCCAT	1440
TAACGTAAAG CTCCTTTACC ATTACGTC	1468

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1785 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 82..1599

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AGCGTAACGG ACCACAAAAG AGGATCCATA CAAATACATC TCATCGCTTC CTCTACTATT	60
CTCCGACACA CACTGAGC A ATG ACG TCC ATT AAC GTA AAG CTC CTT TAC	111
Met Thr Ser Ile Asn Val Lys Leu Leu Tyr	
1 5 10	
CAT TAC GTC ATA ACC AAC CTT TTC AAC CTT TGC TTC TTT CCG TTA ACG	159
His Tyr Val Ile Thr Asn Leu Phe Asn Leu Cys Phe Phe Pro Leu Thr	
15 20 25	
GCG ATC GTC GCC GGA AAA GCC TAT CGG CTT ACC ATA GAC GAT CTT CAC	207
Ala Ile Val Ala Gly Lys Ala Tyr Arg Leu Thr Ile Asp Asp Leu His	



30	35	40	
CAC TTA TAC TAT TCC TAT CTC CAA CAC AAC CTC ATA ACC ATC GCT CCA His Leu Tyr Tyr Ser Tyr Leu Gln His Asn Leu Ile Thr Ile Ala Pro 45 50 55			255
CTC TTT GCC TTC ACC GTT TTC GGT TCG GTT CTC TAC ATC GCA ACC CGG Leu Phe Ala Phe Thr Val Phe Gly Ser Val Leu Tyr Ile Ala Thr Arg 60 65 70			303
CCC AAA CCG GTT TAC CTC GTT GAG TAC TCA TGC TAC CTT CCA CCA ACG Pro Lys Pro Val Tyr Leu Val Glu Tyr Ser Cys Tyr Leu Pro Pro Thr 75 80 85 90			351
CAT TGT AGA TCA AGT ATC TCC AAG GTC ATG GAT ATC TTT TAT CAA GTA His Cys Arg Ser Ser Ile Ser Lys Val Met Asp Ile Phe Tyr Gln Val 95 100 105			399
AGA AAA GCT GAT CCT TCT CGG AAC GGC ACG TGC GAT GAC TCG TCG TGG Arg Lys Ala Asp Pro Ser Arg Asn Gly Thr Cys Asp Asp Ser Ser Trp 110 115 120			447
CTT GAC TTC TTG AGG AAG ATT CAA GAA CGT TCA GGT CTA GGC GAT GAA Leu Asp Phe Leu Arg Lys Ile Gln Glu Arg Ser Gly Leu Gly Asp Glu 125 130 135			495
ACT CAC GGG CCC GAG GGG CTG CTT CAG GTC CCT CCC CGG AAG ACT TTT Thr His Gly Pro Glu Gly Leu Leu Gln Val Pro Pro Arg Lys Thr Phe 140 145 150			543
GCG GCG GCG CGT GAA GAG ACG GAG CAA GTT ATC ATT GGT GCG CTA GAA Ala Ala Ala Arg Glu Glu Thr Glu Gln Val Ile Ile Gly Ala Leu Glu 155 160 165 170			591
AAT CTA TTC AAG AAC ACC AAC GTT AAC CCT AAA GAT ATA GGT ATA CTT Asn Leu Phe Lys Asn Thr Asn Val Asn Pro Lys Asp Ile Gly Ile Leu 175 180 185			639
GTG GTG AAC TCA AGC ATG TTT AAT CCA ACT CCA TCG CTC TCC GCG ATG Val Val Asn Ser Ser Met Phe Asn Pro Thr Pro Ser Leu Ser Ala Met 190 195 200			687
GTC GTT AAC ACT TTC AAG CTC CGA AGC AAC GTA AGA AGC TTT AAC CTT Val Val Asn Thr Phe Lys Leu Arg Ser Asn Val Arg Ser Phe Asn Leu 205 210 215			735
GGT GGC ATG GGT TGT AGT GCC GGC GTT ATA GCC ATT GAT CTA GCA AAG Gly Gly Met Gly Cys Ser Ala Gly Val Ile Ala Ile Asp Leu Ala Lys 220 225 230			783
GAC TTG TTG CAT GTC CAT AAA AAT ACG TAT GCT CTT GTG GTG AGC ACA Asp Leu Leu His Val His Lys Asn Thr Tyr Ala Leu Val Val Ser Thr 235 240 245 250			831
GAG AAC ATC ACT TAT AAC ATT TAC GCT GGT GAT AAT AGG TCC ATG ATG Glu Asn Ile Thr Tyr Asn Ile Tyr Ala Gly Asp Asn Arg Ser Met Met 255 260 265			879
GTT TCA AAT TGC TTG TTC CGT GTT GGT GGG GCC GCT ATT TTG CTC TCC Val Ser Asn Cys Leu Phe Arg Val Gly Gly Ala Ala Ile Leu Leu Ser 270 275 280			927

AAC AAG CCT GGA GAT CGT AGA CGG TCC AAG TAC GAG CTA GTT CAC ACG Asn Lys Pro Gly Asp Arg Arg Arg Ser Lys Tyr Glu Leu Val His Thr 285 290 295	975
GTT CGA ACG CAT ACC GGA GCT GAC GAC AAG TCT TTT CGT TGC GTG CAA Val Arg Thr His Thr Gly Ala Asp Asp Lys Ser Phe Arg Cys Val Gln 300 305 310	1023
CAA GGA GAC GAT GAG AAC GGC AAA ATC GGA GTG AGT TTG TCC AAG GAC Gln Gly Asp Asp Glu Asn Gly Lys Ile Gly Val Ser Leu Ser Lys Asp 315 320 325 330	1071
ATA ACC GAT GTT GCT GGT CGA ACG GTT AAG AAA AAC ATA GCA ACG TTG Ile Thr Asp Val Ala Gly Arg Thr Val Lys Lys Asn Ile Ala Thr Leu 335 340 345	1119
GGT CCG TTG ATT CTT CCG TTA AGC GAG AAA CTT CTT TTT TTC GTT ACC Gly Pro Leu Ile Leu Pro Leu Ser Glu Lys Leu Leu Phe Phe Val Thr 350 355 360	1167
TTC ATG GGC AAG AAA CTT TTC AAA GAT AAA ATC AAA CAT TAC TAC GTC Phe Met Gly Lys Lys Leu Phe Lys Asp Lys Ile Lys His Tyr Tyr Val 365 370 375	1215
CCG GAT TTC AAA CTT GCT ATT GAC CAT TTT TGT ATA CAT GCC GGA GGC Pro Asp Phe Lys Leu Ala Ile Asp His Phe Cys Ile His Ala Gly Gly 380 385 390	1263
AGA GCC GTG ATT GAT GTG CTA GAG AAG AAC CTA GCC CTA GCA CCG ATC Arg Ala Val Ile Asp Val Leu Glu Lys Asn Leu Ala Leu Ala Pro Ile 395 400 405 410	1311
GAT GTA GAG GCA TCA AGA TCA ACG TTA CAT AGA TTT GGA AAC ACT TCA Asp Val Glu Ala Ser Arg Ser Thr Leu His Arg Phe Gly Asn Thr Ser 415 420 425	1359
TCT AGC TCA ATA TGG TAT GAG TTG GCA TAC ATA GAA GCA AAA GGA AGG Ser Ser Ser Ile Trp Tyr Glu Leu Ala Tyr Ile Glu Ala Lys Gly Arg 430 435 440	1407
ATG AAG AAA GGT AAT AAA GTT TGG CAG ATT GCT TTA GGG TCA GGC TTT Met Lys Lys Gly Asn Lys Val Trp Gln Ile Ala Leu Gly Ser Gly Phe 445 450 455	1455
AAG TGT AAC AGT GCA GTT TGG GTG GCT CTA AAC AAT GTC AAA GCT TCG Lys Cys Asn Ser Ala Val Trp Val Ala Leu Asn Asn Val Lys Ala Ser 460 465 470	1503
ACA AAT AGT CCT TGG GAA CAC TGC ATC GAC AGA TAC CCG GTC AAA ATT Thr Asn Ser Pro Trp Glu His Cys Ile Asp Arg Tyr Pro Val Lys Ile 475 480 485 490	1551
GAT TCT GAT TCA GGT AAG TCA GAG ACT CGT GTC CAA AAC GGT CGG TCC Asp Ser Asp Ser Gly Lys Ser Glu Thr Arg Val Gln Asn Gly Arg Ser 495 500 505	1599
TAATAAATGA TGTTTGCTCT CTTTCGTTTC TTTTATTTG TTATAATAAT TTGATGGCTA	1659
CGATGTTTCT CTTGTTTGTT ATGAATAAAG AATGCAATGG TGTTCTAGTA TTTGATTGTT	1719
TTACATGTAT GTATCTCTTA TTTACATGAA ATTTTAAAC GCCTAGGAAA AAAAAAAAAA	1779

WO 01/29238

PCT/EP00/10363

AAAAAA

6

1785